



PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification <sup>6</sup> :</b>  <b>G01B 9/02</b>	<b>A1</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 97/21979</b>  <b>(43) International Publication Date:</b> 19 June 1997 (19.06.97)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/US96/20024 <b>(22) International Filing Date:</b> 10 December 1996 (10.12.96)  <b>(30) Priority Data:</b> 08/571,047                      12 December 1995 (12.12.95)      US  <b>(71) Applicant (for all designated States except US):</b> SPECTRAL DIAGNOSTIC LTD. [IL/IL]; P.O. Box 101, 10551 Migdal Haemek (IL).  <b>(72) Inventors; and</b> <b>(75) Inventors/Applicants (for US only):</b> GARINI, Yuval [IL/IL]; 20126 Mizpe Koranit (IL). KATZIR, Nir [IL/IL]; 3 Hagalil, 23800 Givat Elah (IL). SOENKSEN, Dirk, G. [US/US]; 3639 Cheshire, Carlsbad, CA 92008 (US). CABIB, Dario [IL/IL]; 7 Habrosh, 23840 Timrat (IL). BUCKWALD, Robert, A. [US/IL]; Hadagan Street, 30095 Ramat Yishai (IL). MALIK, Zvi [IL/IL]; 38955 Kfar Haroe (IL).  <b>(74) Agent:</b> FRIEDMAN, Mark, M.; c/o Sheinbein, Robert, 2940 Birchtree Lane, Silver Spring, MD 20906 (US).		<b>(81) Designated States:</b> IL, JP, US, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Published</b> <i>With international search report.</i>
<b>(54) Title:</b> SPECTRAL BIO-IMAGING METHODS FOR BIOLOGICAL RESEARCH, MEDICAL DIAGNOSTICS AND THERAPY  <b>(57) Abstract</b>  Spectral imaging methods (fig. 2) for biological research, medical diagnostics and therapy to be used to detect spatial organization and to quantify cellular (fig. 5) and tissue natural constituents, structures, organelles and administered components such as tagging probes (fig. 27) and drugs using light transmission (fig. 9), reflection, scattering and fluorescence emission strategies (fig. 7), with high sensitivity and high spatial and spectral resolutions.		



【請求項28】 前記疑似ラテンジク解析がグレイレベルもしくは疑似カラーイメージを作りだし、明るいピクセルが小さなスベクトル差に対応し、暗いピクセルが大きなスベクトル差に対応することを特徴とする請求項27に記載の方法。

【請求項29】 前記疑似ラテンジク解析がグレイレベルもしくは疑似カラーイメージを作りだし、ここでは明るいピクセルが大きなスベクトル差に対応し、暗いピクセルが小さなスベクトル差に対応することを特徴とする請求項27に記載の方法。

【請求項30】 前記スベクトル差が、各ピクセルのスベクトルと参照スベクトルとの差の絶対値を所定変長レンジにおいて積分して定義されるスカラーであることを特徴とする請求項27に記載の方法。

【請求項31】 前記数学的アルゴリズムが疑似ラテンジク解析であり、これにより、各ピクセルのスベクトルにおけるいくつかの参照スベクトルからのスベクトル差を計算することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項32】 前記分頻ラテンジク解析が疑似カラーイメージを作りだし、このイメージにおいていくつかの参照スベクトルの一つに対して所定最大スベクトル差を有する一群のピクセルが所定疑似カラーにより着色されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項33】 前記スベクトル差が、各ピクセルのスベクトルと前記いくつかの参照スベクトルの一つとの差の絶対値を所定変長レンジにおいて積分して定義されるスカラーであることを特徴とする請求項31に記載の方法。

【請求項34】 前記数学的アルゴリズムが主要コンポーネント解析であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項35】 前記主要コンポーネント解析が、  
(a) 全測定ピクセルおよび変長、なお、変長変長が用いられるときには補助変長の値を含む、の共変マトリクスを構築し、  
(b) この共変マトリクスを対角化するとともに全直交スベクトルベースエレメントを見つけたし、  
(c) このベースエレメントがサンゾルの所定特徴を有するかを算出する

【請求項36】 前記数学的アルゴリズムが一次結合解析であることを特徴とする請求項1に記載の方法。  
【請求項37】 前記一次結合解析が、前記第1のスベクトルキューブデータおよび前記第2のスベクトルキューブデータに属する一対の対応ピクセルの対応変長間計算に適用して、第3スベクトルキューブデータを求めるようになっていることを特徴とする請求項36に記載の方法。

【請求項38】 前記一次結合解析は、二つのスベクトルキューブデータの平均値算、時間変化追跡およびスベクトル正規化からなるグループから選択されることを特徴

とする請求項36に記載の方法。

【請求項39】 前記一次結合解析は、算術関数によって各ピクセルのスベクトル変長全てに所定スカラーを与えるものであり、この算術関数は加算、減算、乗算、除算およびこれらの組み合わせからなるグループから選択されることを特徴とする請求項36に記載の方法。

【請求項40】 前記一次結合解析はバウンダラウンドの除去に用いられ、サンゾルのバウンダラウンドに位置するピクセルのスベクトルがサンゾルのピクセルのスベクトルから引き去られることを特徴とする請求項36に記載の方法。

【請求項41】 前記一次結合解析が校正処理に用いられ、サンゾル観察前に測定されたスベクトルのサンゾルのピクセルのスベクトルを修正するために用いられることを特徴とする請求項36に記載の方法。

【請求項42】 前記数学的アルゴリズムが光密度解析であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項43】 前記光密度解析が光密度ラテンジクである変換イメージを得るためのものであることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項44】 前記数学的アルゴリズムが密度変換された変長レンジを用いて補助カラーイメージを計算することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項45】 前記数学的アルゴリズムはピクセルの各スベクトル用の二つの異なる変長間の比を算出することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項46】 前記数学的アルゴリズムはピクセルの各スベクトル用の二つの異なる変長間の比を算出し、このように算出された比に応じて、各ピクセルの明色もしくは暗色の人口色で着色することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項47】 前記方法は、サンゾルに投与された多重蛍光増感体のスベクトルを特定を行うために用いられることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項48】 前記方法は、サンゾルにおけるミクロ的な環境変化を検出するために用いられることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項49】 前記ミクロ的な環境変化は、局所的な電位、pHレベルおよび細胞間のイオン集中からなるグループから選択されることを特徴とする請求項48に記載の方法。

【請求項50】 前記イオンが水素イオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン、亜鉛イオンおよびカルシウムイオンからなるグループから選択されることを特徴とする請求項49に記載の方法。

【請求項51】 前記方法は前記サンゾル内の自然成分からの自己蛍光を測定するために用いられることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項52】 前記自然成分が、葉緑素、ポルフィリンおよび細胞蛋白質からなるグループから選択されること

を特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項53】 前記サンゾルが、網膜、網膜血管、腫瘍、皮膚、角膜、髪、筋、胃、腸、膀胱、結膜、前立腺、頸部、頸部、静脈、心臓およびミミズ細胞からなるグループから選択されることを特徴とする請求項51に記載の方法。

【請求項54】 前記方法は、生物学研究、薬品製造産業、病理学における細胞および組織分画、血液学、尿中のケラチンの存在解析、染色体中での遺伝子識別およびバイオセンシング、遺伝子診断、細胞器官解剖学および生理学、細胞膜におけるクロマチン分配および細胞、細胞質結合および成分ラテンジク、核膜ラテンジク、皮膚癌のラテンジク、黒色腫およびびくらの識別、ポートイン増強、および光学的治療の前、間および後の皮膚画像作成からなる用途グループから選択される用途のために用いられることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項55】 前記細胞質成分はNMD<sup>+</sup>、NMD<sup>-</sup>、フラビンおよびチトクロームからなるグループから選択されることを特徴とする請求項54に記載の方法。

【請求項56】 前記方法は、サンゾルにおける少なくとも二つの蛍光間の空間分離を決定する蛍光増感エネルギー移動を測定するために用いられることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項57】 前記蛍光増感体のうち少なくとも一つはサンゾルに外部から投与されることを特徴とする請求項56に記載の方法。

【請求項58】 前記サンゾルが細胞、組織および微生物からなるグループから選択され、前記方法はサンゾルにおける細胞および細胞レベル以下の詳細の観察およびラテンジクを行うために用いられることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項59】 前記サンゾルはRomanowsky-Giesma染色法、Romanowsky-Giesma染色法およびMay-Grunwald-Giesma染色法からなるグループから選択された方法により着色されることを特徴とする請求項58に記載の方法。

【請求項60】 前記細胞レベル以下の詳細は、核におけるクロマチン組織のタイプであり、このタイプは異質染色質および均質染色質からなるグループから選択されることを特徴とする請求項59に記載の方法。

【請求項61】 前記サンゾルが細胞、組織および微生物からなるグループから選択され、前記方法はサンゾルにおける生命プロセスを時間と関連してモニタリングするために用いられることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項62】 (a) 少なくとも一つの蛍光染料を用いて少なくとも一つの細胞分子を特定し、少なくとも一つの蛍光増感体グループを得るラテンジク、  
(b) 生物サンゾルの細胞組織と前記グループとを交配

とせるラテンジク、

(c) 増感分光計に光学的に繋がった蛍光顕微鏡を通して生物サンゾルを観察する間に、

(1) 平行光学系を用いて生物サンゾルの全ピクセルからの射出光を同時に集光し、

(ii) この射出平行光を増感のエレメントを有する干渉計システムを通して、干渉計内を異なる方向に進む二つの干渉ビームに分離し、そして、これらの二つの干渉ビームを互いに干渉させて再結合させ干渉ビームを生成し、

(iii) この干渉ビームを合焦光学システムを通して二次元配列の射出エレメントを有する射出器に合焦させ、各時点において、前記射出器要素の各々が、測定の間隔にわたり前記サンゾルの一つの素に同一のピクセルの像となり、

15 際サンゾルの画像が射出器アレーの面上で静止し測定の間隔にわたり画像が可視的で、かつ、識別可能な状態となるようにし、

前記射出器要素の各々によって、各時点についての光路差の関数として、異なる変長で前記ピクセルから集められた光の強度の特定の一次結合となる像を生成し、

(iv) 干渉計システムの一つもしくは複数の要素を回転させることによって、

干渉計システムにより作られた二つの干渉ビーム間の光路差を、生物サンゾルの全ピクセルについて同時に進進

25 (v) 記録装置を用いて時間間隔として各射出エレメントの信号を記録して、第1スベクトルキューブデータを形成し、生物サンゾルの各ピクセルのスベクトルを得るラテンジク、及び

(d) 数学的アルゴリズムを用いて前記第1スベクトルキューブデータを変換するラテンジク、

【請求項63】 (a) 少なくとも一つの数値グループと生物サンゾルの細胞組織とを交配させるラテンジク、

(b) 前記少なくとも一つのグループを少なくとも一つの蛍光染料により特定するラテンジク、

(c) 増感分光計に光学的に繋がった蛍光顕微鏡を通して生物サンゾルを観察する間に、

(i) 平行光学系を用いて生物サンゾルの全ピクセルからの射出光を同時に集光し、

(ii) この射出平行光を増感のエレメントを有する干渉計システムを通して、干渉計内を異なる方向に進む二つの干渉ビームに分離し、これらの二つの干渉ビームを互いに干渉させて再結合させ干渉ビームを生成し、

(iii) この干渉ビームを合焦光学システムを通して二次元配列の射出要素を有する射出器に合焦させ、各時点において、前記射出器要素の各々が、測定の間隔にわたり前記サンゾルの一つの素に同一のピクセルの像となり、

探サソノルの実像が検出器アレーの面上で静止し測定の全期間にわたって状態が可視的で、かつ、識別可能な状態となるようにし、

前記検出器要素の各々によって、各時点についての光路差の関数として、異なる波長で前記ビクセルから発せられた光の強度の特定の一連結合となる信号を生成し、

(iv) 干渉計システムの一つもしくは複数の要素を回転させることによって、

この干渉計システムにより作られた二つの干渉ビーム間の光路差を、生物サソノルの各ビクセルについて同時に走査し、

(v) 記録装置を用いて時間の関数として各検出エレメントの信号を記録し、第1スベクトルキエーゾデータを形成して、生物サソノルの各ビクセルのスベクトルを得るソフトウェア、及び

(d) 数学的アルゴリズムを用いて前記第1スベクトルキエーゾデータを変換するソフトウェア、

からなることを特徴とする分光法。

【請求項64】 前記数学的アルゴリズムが分類ソフトウェア解析であり、これにより、各ビクセルのスベクトルにおけるいくつかの参照スベクトルからのスベクトル差を計算することを特徴とする請求項62に記載の方法。

【請求項65】 前記数学的アルゴリズムが一次結合解析であり、背景を除去するためのものであることを特徴とする請求項63に記載の方法。

【請求項66】 追加の数学的アルゴリズムとしての分類ソフトウェア解析を用いるソフトウェアをさらに有し、この追加数学的アルゴリズムにより前記各ビクセルのスベクトルに關して、少なくとも一つの参照スベクトルとのスベクトル差を計算することを特徴とする請求項65に記載の方法。

【請求項67】 前記分類ソフトウェア解析が、前記各ビクセルのスベクトルに關して、少なくとも一つの参照スベクトルとのスベクトル差を計算するソフトウェアを含むことを特徴とする請求項64に記載の方法。

【請求項68】 前記分類ソフトウェア解析が、前記各ビクセルのスベクトルに關して、少なくとも一つの参照スベクトルとのスベクトル差を計算するソフトウェアを含むことを特徴とする請求項66に記載の方法。

【請求項69】 (a) 解析用の細胞スミアを準備するソフトウェア、

(b) 撮像分光計に光学的に接続した透過顕微鏡により前記細胞スミアを観察する間に、

(i) 平行光学系を用いて細胞スミアの全ビクセルからの射出光を同時に集光し、

(ii) この射出平行光を複数の要素を有する干渉計システムに通して、干渉計内を異なる方向に通む二つの干渉ビームに分離し、そして、これら二つの干渉ビームを互いに干渉させて再結合させ回折ビームを生成し、

(iii) この回折ビームを合焦光学システムに通して二

次元配列の検出要素を有する検出器に合焦させ、

各時点において、前記検出器要素の各々が、測定の全期間にわたって前記サソノルの1つの常に同一のビクセルの後となり、

探サソノルの実像が検出器アレーの面上で静止し測定の全期間にわたって状態が可視的で、かつ、識別可能な状態となるようにし、

前記検出器要素の各々によって、各時点についての光路差の関数として、異なる波長で前記ビクセルから発せられた光の強度の特定の一連結合となる信号を生成し、

(iv) 干渉計システムの一つもしくは複数の要素を回転させることによって、

干渉計システムにより作られた二つの干渉ビーム間の光路差を、細胞スミアの各ビクセルについて同時に走査し、

(v) 記録装置を用いて時間の関数として各検出エレメントの信号を記録して、第1スベクトルキエーゾデータを形成し、細胞スミアの各ビクセルのスベクトルを得るソフトウェア、及び

(c) 数学的アルゴリズムを用いて前記第1スベクトルキエーゾデータを変換するソフトウェア、

からなることを特徴とする細胞分類方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野及び背景

本発明はスベクトル法に關し、さらに詳しくは、生物学研究、医療診断および商業用の分光画像（イメージング）法に關し、以下、この方法を分光生物像法と称する。本発明に係る方法は、空間的な構成（すなわち、分布）を検出した後、細胞および組織の自然組成、構造、器官および同位体トレーサースローブ（例えば、蛍光プローブ）のような処理リポソーム、並びに光透過、反射、散乱および強光を利用する要素等を、高い空間およびスベクトル解像度で計量したりするために用いることができる。

35 分光計は、光を受光してその成分波長に分離（分散）させ、波長を関数とする光の強度である光スベクトルを測定するためには設計された装置である。撮像（イメージング）分光計は、対象から射出される光を集めて各ビクセル（画素）のスベクトルを測定する装置である。

40 分光学は、化学成分のスペクトル特性に基づいて材料およびプロセスを特徴付けるために、科学および産業分野において何十年も用いられてきている周知の分析ツールである。分光学の物理的原理は、光と物質との相互作用である。伝統的に、分光学は、サソノルからの射出

45 光、透過光、散乱光および反射光の強度を、波長の関数として、高いスベクトル解像度で、測定するものであるが、空間的な情報量は著しいでない、

一方、高い解像度の分光学と高い解像度の撮像法（すなわち、空間情報）との合成である分光撮像（スベクトル撮像）法は、生物サソノルの解析には用いられていな

い、現在の所でも近いものとしては、限られたスベクトル情報のみを提供しつつ生物サソノルから高い空間解像度の情報を得る物があるだけであり、このようなものの例として、一つもしくはいくつもの独立したバンドパスフィルターを用いて高い空間解像度の撮像を行うものがある（Anderson-Engels等による「Proceedings of SPIE—Biomaging and Two-Dimensional Spectroscopy」, 1205, pp. 179–180 (1990)）参照。また、サソノルのいくつかの点もしくはサソノル全体の平均に於いて高い空間的な解像度（例えば、全スベクトル）を得るものもある（Alfano等による米国特許第4,930,516号参照）。

以下に詳細に説明するように、分光学と撮像法とを組み合わせてすることは、様々な生物学的研究および医学的用途に有用である。一例を挙げれば、蛍光プローブで分類（トレース）された後において、特定の細胞組成（例えば、蛋白質、核酸配列）の検出がある。このように分光撮像法は、一回の測定でいくつもの蛍光体を測定し同時にその分布を特定するために用いることができる。実際、分光撮像法に固有の高い解像度は、重なり合うスベクトル領域を有した蛍光プローブ（もしくはその他の化学成分）を分離するのに適している。同様に、分光撮像法は、像のどの位置であっても、サソノルの項的な不均一性（例えば、pH等）により生じる微妙なスベクトルシフトの検出も可能である。

概観上は、分光生物像法システムは、(1) 計測システムと、(2) 解析ソフトウェアとからなる。計測システムは、光学および電子工学の全てを有し、サソノルの照明源（例えば、光源の選択）、測定モード（蛍光、反射、透過）を分類するのに適している。同様に、分光撮像法は、像のどの位置であっても、サソノルの項的な不均一性（例えば、pH等）により生じる微妙なスベクトルシフトの検出も可能である。

概観上は、分光生物像法システムは、(1) 計測システムと、(2) 解析ソフトウェアとからなる。計測システムは、光学および電子工学の全てを有し、サソノルの照明源（例えば、光源の選択）、測定モード（蛍光、反射、透過）を分類するのに適している。同様に、分光撮像法は、像のどの位置であっても、サソノルの項的な不均一性（例えば、pH等）により生じる微妙なスベクトルシフトの検出も可能である。

以下に詳細に説明するように、分光学と撮像法とを組み合わせてすることは、様々な生物学的研究および医学的用途に有用である。一例を挙げれば、蛍光プローブで分類（トレース）された後において、特定の細胞組成（例えば、蛋白質、核酸配列）の検出がある。このように分光撮像法は、一回の測定でいくつもの蛍光体を測定し同時にその分布を特定するために用いることができる。実際、分光撮像法に固有の高い解像度は、重なり合うスベクトル領域を有した蛍光プローブ（もしくはその他の化学成分）を分離するのに適している。同様に、分光撮像法は、像のどの位置であっても、サソノルの項的な不均一性（例えば、pH等）により生じる微妙なスベクトルシフトの検出も可能である。

以下に詳細に説明するように、分光学と撮像法とを組み合わせてすることは、様々な生物学的研究および医学的用途に有用である。一例を挙げれば、蛍光プローブで分類（トレース）された後において、特定の細胞組成（例えば、蛋白質、核酸配列）の検出がある。このように分光撮像法は、一回の測定でいくつもの蛍光体を測定し同時にその分布を特定するために用いることができる。実際、分光撮像法に固有の高い解像度は、重なり合うスベクトル領域を有した蛍光プローブ（もしくはその他の化学成分）を分離するのに適している。同様に、分光撮像法は、像のどの位置であっても、サソノルの項的な不均一性（例えば、pH等）により生じる微妙なスベクトルシフトの検出も可能である。

以下に詳細に説明するように、分光学と撮像法とを組み合わせてすることは、様々な生物学的研究および医学的用途に有用である。一例を挙げれば、蛍光プローブで分類（トレース）された後において、特定の細胞組成（例えば、蛋白質、核酸配列）の検出がある。このように分光撮像法は、一回の測定でいくつもの蛍光体を測定し同時にその分布を特定するために用いることができる。実際、分光撮像法に固有の高い解像度は、重なり合うスベクトル領域を有した蛍光プローブ（もしくはその他の化学成分）を分離するのに適している。同様に、分光撮像法は、像のどの位置であっても、サソノルの項的な不均一性（例えば、pH等）により生じる微妙なスベクトルシフトの検出も可能である。

以下に詳細に説明するように、分光学と撮像法とを組み合わせてすることは、様々な生物学的研究および医学的用途に有用である。一例を挙げれば、蛍光プローブで分類（トレース）された後において、特定の細胞組成（例えば、蛋白質、核酸配列）の検出がある。このように分光撮像法は、一回の測定でいくつもの蛍光体を測定し同時にその分布を特定するために用いることができる。実際、分光撮像法に固有の高い解像度は、重なり合うスベクトル領域を有した蛍光プローブ（もしくはその他の化学成分）を分離するのに適している。同様に、分光撮像法は、像のどの位置であっても、サソノルの項的な不均一性（例えば、pH等）により生じる微妙なスベクトルシフトの検出も可能である。

以下に詳細に説明するように、分光学と撮像法とを組み合わせてすることは、様々な生物学的研究および医学的用途に有用である。一例を挙げれば、蛍光プローブで分類（トレース）された後において、特定の細胞組成（例えば、蛋白質、核酸配列）の検出がある。このように分光撮像法は、一回の測定でいくつもの蛍光体を測定し同時にその分布を特定するために用いることができる。実際、分光撮像法に固有の高い解像度は、重なり合うスベクトル領域を有した蛍光プローブ（もしくはその他の化学成分）を分離するのに適している。同様に、分光撮像法は、像のどの位置であっても、サソノルの項的な不均一性（例えば、pH等）により生じる微妙なスベクトルシフトの検出も可能である。

以下に詳細に説明するように、分光学と撮像法とを組み合わせてすることは、様々な生物学的研究および医学的用途に有用である。一例を挙げれば、蛍光プローブで分類（トレース）された後において、特定の細胞組成（例えば、蛋白質、核酸配列）の検出がある。このように分光撮像法は、一回の測定でいくつもの蛍光体を測定し同時にその分布を特定するために用いることができる。実際、分光撮像法に固有の高い解像度は、重なり合うスベクトル領域を有した蛍光プローブ（もしくはその他の化学成分）を分離するのに適している。同様に、分光撮像法は、像のどの位置であっても、サソノルの項的な不均一性（例えば、pH等）により生じる微妙なスベクトルシフトの検出も可能である。

以下に詳細に説明するように、分光学と撮像法とを組み合わせてすることは、様々な生物学的研究および医学的用途に有用である。一例を挙げれば、蛍光プローブで分類（トレース）された後において、特定の細胞組成（例えば、蛋白質、核酸配列）の検出がある。このように分光撮像法は、一回の測定でいくつもの蛍光体を測定し同時にその分布を特定するために用いることができる。実際、分光撮像法に固有の高い解像度は、重なり合うスベクトル領域を有した蛍光プローブ（もしくはその他の化学成分）を分離するのに適している。同様に、分光撮像法は、像のどの位置であっても、サソノルの項的な不均一性（例えば、pH等）により生じる微妙なスベクトルシフトの検出も可能である。

以下に詳細に説明するように、分光学と撮像法とを組み合わせてすることは、様々な生物学的研究および医学的用途に有用である。一例を挙げれば、蛍光プローブで分類（トレース）された後において、特定の細胞組成（例えば、蛋白質、核酸配列）の検出がある。このように分光撮像法は、一回の測定でいくつもの蛍光体を測定し同時にその分布を特定するために用いることができる。実際、分光撮像法に固有の高い解像度は、重なり合うスベクトル領域を有した蛍光プローブ（もしくはその他の化学成分）を分離するのに適している。同様に、分光撮像法は、像のどの位置であっても、サソノルの項的な不均一性（例えば、pH等）により生じる微妙なスベクトルシフトの検出も可能である。

以下に詳細に説明するように、分光学と撮像法とを組み合わせてすることは、様々な生物学的研究および医学的用途に有用である。一例を挙げれば、蛍光プローブで分類（トレース）された後において、特定の細胞組成（例えば、蛋白質、核酸配列）の検出がある。このように分光撮像法は、一回の測定でいくつもの蛍光体を測定し同時にその分布を特定するために用いることができる。実際、分光撮像法に固有の高い解像度は、重なり合うスベクトル領域を有した蛍光プローブ（もしくはその他の化学成分）を分離するのに適している。同様に、分光撮像法は、像のどの位置であっても、サソノルの項的な不均一性（例えば、pH等）により生じる微妙なスベクトルシフトの検出も可能である。

以下に詳細に説明するように、分光学と撮像法とを組み合わせてすることは、様々な生物学的研究および医学的用途に有用である。一例を挙げれば、蛍光プローブで分類（トレース）された後において、特定の細胞組成（例えば、蛋白質、核酸配列）の検出がある。このように分光撮像法は、一回の測定でいくつもの蛍光体を測定し同時にその分布を特定するために用いることができる。実際、分光撮像法に固有の高い解像度は、重なり合うスベクトル領域を有した蛍光プローブ（もしくはその他の化学成分）を分離するのに適している。同様に、分光撮像法は、像のどの位置であっても、サソノルの項的な不均一性（例えば、pH等）により生じる微妙なスベクトルシフトの検出も可能である。

以下に詳細に説明するように、分光学と撮像法とを組み合わせてすることは、様々な生物学的研究および医学的用途に有用である。一例を挙げれば、蛍光プローブで分類（トレース）された後において、特定の細胞組成（例えば、蛋白質、核酸配列）の検出がある。このように分光撮像法は、一回の測定でいくつもの蛍光体を測定し同時にその分布を特定するために用いることができる。実際、分光撮像法に固有の高い解像度は、重なり合うスベクトル領域を有した蛍光プローブ（もしくはその他の化学成分）を分離するのに適している。同様に、分光撮像法は、像のどの位置であっても、サソノルの項的な不均一性（例えば、pH等）により生じる微妙なスベクトルシフトの検出も可能である。

1) 光学干渉分光法である。後述するように、光学干渉分光法は本発明の方法を行うのに最適である。

例えば、DILORシステム（Valisat等 (1995年9月) によるthe SPIE Conference European Medical Optics No. 6, BIOS Europe '95, スペクトルカメラセロでの発表参照）のように、スリットタイプの撮像分光計としてよく知られている格子分光（すなわち、モノローグラー）に基づくシステムにおいて、CODレイ検出器の一つの軸（空間軸）のみが実際のイメージングを提供し、

第2軸（スベクトル軸）は、波長の関数として格子によって分散される光の強度をサンプリングするために用いられる。このシステムはまた第1の焦点平面にスリットを有し、どの時間においても境界をビクセル領域に限定している。このため、この方法では、入カビームをCODのスベクトル軸に平行な方向に走査、すなわち、ライン走査して初めて全体像を得ることができる。全ての計測が完了する前には二次元イメージを得ることができないため、測定前に、計測領域内で所望の領域を最適化したり、システム焦点を最適化したり、露出時間を最適化したりすることはできない。格子分光に基づくスベクトルイメージは、遠隔計測用途では一般的に用いられている。これは、地球の上を飛行する航空機（もしくは衛星）は自然なライン走査撮像システムを有するからである。

スリットタイプ撮像分光計は、計測の前面に光学系により全ビクセルと同時に測定される時間と同時に、一つのフレーム上のビクセルに測定される時間は同時に決まるといふ大きな欠点を有する。このため、所定のSNRで必要な情報を得るには比較的に長い計測時間が必要であり、逆に所定時間の測定ではSNR（感度）はそれだけ低くなる。さらに、スリットタイプの撮像分光計は、全面について必要な情報を集めるにはライン走査が必要であるため、測定結果精度は低下しやすい。

ラインカメラを用いるスベクトル分散法はさらに、独立ラインカメラとチューナブルラインカメラとに分類できる。これらのタイプの撮像分光計においては、スベクトルイメージは、光路内に集光ビームがスベクトルカメラを挿入して、異なる波長域に、且つ各時間域に、画面内の全ビクセルに照射される光にイメージングをかけて画像を得たり、AOTもしくはLCF（下記参照）を用いて電氣的に波長域を走査して得られる。ラインカメラ—スベクトル分散法を用いても、上述した格子を用いてスリットタイプの撮像分光計と同様に、各時間においては照射光の大部分は用いられない、実際、測定される波長以外の光子は全てはねられてCODに到達しないので、特定の波長の全体像が測定できるだけである。

音響—光学チューナブルラインカメラ（AOTs）および液晶チューナブルラインカメラ（LCRs）のようなチューナブルラインカメラは可動部材を有しておらず、これらが装載される装置のスベクトルイメージにおける任意の波長にチューンすることができ、分光撮像分散法として使

ユーザがリアルタイムを用いる利点の一つは、任意に波長を選択できること、すなわち、リアルタイムを用いることなく、任意の順序で多くの波長での強度分布イメージを測定できる能力である。しかしながら、AOTFおよびVCTFは、(i) スペクトルレンジが限られ、(例)例えば、 $\lambda_{max} = 2.5 \mu m$ 、このレンジ外の光は全て遮断されなければならない、(ii) 温度に敏感である、(iii) 透過率が低い、(iv) 偏光性がある、(v) AOTFの場合には波長走査中にイメージング効果があるという欠点を有する。

このようなリアルタイムおよびユーザがリアルタイムベースのシステムは全て、スペクトル解像度に限界があり、感度が低く、剛直性に欠け、データの交換および表示のためのソフトウェアアルゴリズムが複雑であるため、どのような用途においても分光画像としては長年にわたって継続して且つ広範囲にわたって用いられるものではなかった。上述のように、本発明の発明者は、分光型分光画像およびここで提案されているような解析および表示アルゴリズムを用い、生体臨床医学に適用できる高解像度の撮像系と組み合わせた高解像度の分光学について述べた文献を全く発見できなかった。但し、上述したように、高解像度の撮像系と組み合わせた低解像度および低感度の分光計や、サンプリングの一次所もしくは数カ所についての高解像度の分光計についてある程度研究した文献や、特許は見つかった。例えば、(1) 細胞遺伝学に関するRiedel (Jan 1994) Fluoreszenz in situ Hybridisierung in der zoonischen Diagnostik, Faculty of theoretical medicine Ruprecht-Karls University Heidelberg、(2) 細胞内の薬物分布に關してMantlat and Chazotte (1995) Fluorescence spectral imaging: State of the art and perspectives, 'AFC CYTOMETRIE '95, Reims France Sep. 27th-29th, 1995 において発表、(3) 組織がん検診に關してAlfano et al. による米国特許第5,930,516号(Anderson-Engels (1990) Proceedings of SPIE, Bio-Imaging and Two-Dimensional Spectroscopy, 1205, pp. 179-189、およびPetrakis et al. (1995), Paper presented at European Bioimaging Optics Week by SPIE, 12-16 September 1995, Barcelona Spain、(4) 細胞レベルにおけるがんの特性表示に關してWied et al. (1991) Computer Distalination of Ectocervical Cells, The International Academy of Cytological Analytical and Quantitative Cytology Vol. 3, p. 225、(5) 眼科学に關してDeJori (1995) Appl. Optics Vol. 27, 1113, 1988およびAppl. Optics Vol. 28, 1061,並びにシリコンカメラおよび蛍光血管造影に關する他の文献、例えば、DeJori et al. (198 Vision Research, Vol. 20, 1099等がある。

しかしながら、これらの文献および特許は、使用されるハードウェアという観点において本発明とは異なる。このハードウェアとは、高い空間およびスペクトル解像度を得られる組み合わせ、結果を解析し表示するために用いられるアルゴリズム、そして最後に、細胞および/もしくは組織レベルにおいて診断的、研究等である。医に与える化学生理解および物理的な兆候等である。

上記の点で使われている画像のスペクトル解析の方法および装置は、1995年2月21日出願のCabo社による米国特許出願第08/392,019号に開示されている。なお、この特許出願は、画像のスペクトル解析用の装置および方法を提供するために、全て本件出願の内容として取り込まれる。この装置および方法によれば、画像からの射出光を集めて得られる全情報に有効に利用して、従来のスペクトライタもしくはリアルタイムの画像スペクトルメーターに比べて、フレーム時間を大きく低減しさらに/もしくはSN比を大きく向上させ、さらにライオン走査を含まない。本発明によれば、各ピクセルのスペクトル強度を求め、対象の光がイメージを解析する方法が提供される。このため、対象からの射出光を集め、各ピクセルからの射出光のスペクトル強度をリニアに集めた所定セットに対応して、調整された光を出力する干渉計を通して、この干渉計からの光を射出アレイの上に集め、全ピクセルについて独立して且つ同時に光干渉計において作られた光路差 (OPD) を走査後出し、後出器アレイの出力 (全ピクセルそれぞれの干渉像) を処理して各ピクセル毎のスペクトル強度を求める。この方法は様々なタイプの干渉計を用いて実行され、この場合、干渉計全体、干渉計内の一要素もしくは入射光の入射角を変動させてOPDが変えられて干渉像が作られる。これら全ての場合において、スクイザーが干渉計の一回の走査を完了すると、画面に全ピクセルの干渉像が完成する。上記の特性を有した装置は、上述のように干渉計を用いてることにより、従来のシリコンカメラもしくはリアルタイムの画像スペクトルメーターと異なり、このため、集めたエネルギーを小さくはシリコンに限定したり、干渉もしくはイメージングアルゴリズムにより狭い波長域に限定したシリコンが可能なく、その結果、システム全体としてのスループットが向上する。このように干渉計全体としての装置は、解析すべき対象からの射出光から得られる全情報を有効に利用でき、測定時間を大幅に低減させさらに、もしくはSN比 (すなわち、感度) を大幅に向上させる。例えば、John B. Weisman (1987) Imaging Spectrometers for Terrestrial and Planetary Remote Sensing, SPIE Proceedings, Vol. 750, p. 140に述べられている "whisk broom" を考えてみる。ここで、nをリニアアレイにおける検出器の数とし、mをmをフレーム内のピクセル数とし、Tをフレーム時間とする。フレームのフレームにおける検出器の数とし、mをmをフレームのフレームについて合計した時間は、mTである。米国特許出願第08/392,019号に開示の発明に係る方法の場合には、同一カメラのアレイで同一のフレームレートを用いければ、特定のピクセルについて全検出器の合計使用

時間は、 $mT/n$ である。しかしながら、従来の格子法においては各時間において全検出器によって見られるエネルギーは、波長解像度がそのレンジの1/nであるので、全エネルギーの1/nのオーダーとなる。これに対して、米国特許出願第08/392,019号に開示の発明に係る方法の場合には、モジュレーティング関数がラージOPDレンジについての平均が50%となる振動関数 (例えば、フーリエ変換 Fourier-Parrot) を有した低フレイムエアー関数 (low finesse Airy function) のようなシステム (4) (low finesse Airy function) のようなシステム (4) (low finesse Airy function) もしくはこれと同様の周期的な関数) であるので、1のオーダーとなる。干渉学の教科書 (例えば、Chamberlain (1979) The principles of interferometric spectroscopy, John Wiley and Sons, pp. 16-18 and p. 266参照) に述べられているFollett効果 (もしくは多重効果) の構造処理に基づけば、本発明に係る装置は、ノイズレベルが信号からは独立しているというノイズ制限条件 (システムもしくはイメージングソフトウェアが限定される条件) においては、 $n^{1/2}$ のフアクターで改善され、且つ、前記制限が信号光子ノイズにより生じる場合での狭いピーク波長におけるスペクトルレンジにおいて、特定の波長の信号に対する平均信号の比の平方根で改善されるようなSN比の測定を有するということを示すことができる。このように、米国特許出願第08/392,019号に開示の発明によれば、スペクトルの再構築に必要な全情報を得るために、必要のOPDの全てが画像の全ピクセルについて同時に走査され、これにより、画像情報とともにスペクトル情報と同時に集められる。この情報明は、遠隔検査のための望遠鏡、実験室での解析用の顕微鏡、産業上でのモニタ用の光ファイバースコープおよび医学的に薬物、診断、治療等のような様々な光学的な構成として用いられる。

分光生物撮像システムは、潜在的に、画像中での空間分布および組成を注目すべき化学成分間で、微細なスペクトル差が存在する適用例に有用である。この計測は、本質的には、特許出願第08/392,019号に述べられているシステムに付属するいわゆる分光システムを用いて行われ、このような分光システムとしては、例えば、直立もしくは反転型顕微鏡、蛍光顕微鏡、マイクロレンズ、内視鏡および顕微鏡カメラがある。さらに、光透過 (明視野および偏視野)、自己蛍光および受光プロパゴの蛍光等を含む標準的な実験方法を用いることができる。

蛍光計測は、出力スペクトルがシステム感度のスペクトルレンジ内にあると仮定して、個々のリアルタイムイメージング (バリアリアルタイム、前記リアルタイムおよびバリアリアルタイム) もしくは検出器用途のカスタマイズされたリアルタイムイメージングを用いて行うことができる。分光生物撮像法は、暗視野および近接道のような標準空間イメージング法とともに、さらには偏光顕微鏡検査とともにも用いることができる。このような方法を用いるときでのスペクトル情報の効果は、計測スペクトル像を正しく変換することである。

光透過および蛍光顕微鏡検査法において分光生物撮像システム用の実験的な方法および特殊な用途はたくさんある。このような方法および用途としては、これに限られるものではないが次のようなものがある。(1) 光透過顕微鏡検査-着色組織サンプリングの計測、(2) 蛍光顕微鏡検査: (i) 多重蛍光検出体のスペクトル認識、(i) 細胞レベル以下の区画 (例えば、pH, Ca<sup>2+</sup>イオン濃度) におけるミクロ的な環境変化および発酵特性の検出、(iii) 自然色 (例えば、葉緑素) からの自己蛍光の計測、および (iv) 蛍光共鳴エネルギートランスフュー (FRET)。これ以外の可能性のある用途としては、(1) 時間分解スペクトル画像 (適切な外部トリガーを有した格子強化CCDを用いて得られる)、(2) ランダム散乱計測、がある。

Human Genome Project (HGP) の主たる利点の一つは、病理解毒およびその他の染色体異常および構造のための多数の複製プロローグの分離であった。このことは、周知し得るデータの数のおよびダイナミクスからプロローグに依存しているため、HGPにおける興味を呼び起こした。近年においては、fluorescent in situ hybridization (FISH) において特に関心をもたれており、この (FISH) とは、試験した染色体領域を特定の複製プロローグに共有する蛍光部分でマーカーを行うプロセスであり、これに続いて蛍光顕微鏡検査により蛍光部分が可視化される。

基本的な実験室内において伝統的にFISHが用いられているが、これと並行して、臨床分野においてもFISH技術が用いられるようになってきている。FISHは細胞遺伝学への最も進んだプロローグであると考えられており、FISHから得られる染色体に關する情報量は、DNA-プロッパング法によって標準的な型から得られる情報よりずっと多い。さらに、クランカナル (中期の) 細胞遺伝学に比べて、休止期の細胞遺伝学のような技術を用いられ、診断情報をずっと速く得ることができる。

本発明によればFISH検出法が提供され、これによれば、顕微鏡の視野内の全ピクセルから蛍光スペクトルを同時に得ることができ、一回の実験で多くのプロローグの位置を検出することができる。染色体の特定プロローグを用いることができることも新しいランパング法を用いることにより、この方法は、複製染色体を異なる色 (すなわち、人間の細胞型用の4nの異なる色) に着色することによりFISH検出法を作り出すことができる。これにより非常に高いサンプリングスループットが達成でき、本質的にプロローグの数に制限されない解析が可能となる。

本発明の別の利点は、生体サンプルから白色光、紫外光もしくはレーザー-励起蛍光スペクトルの量的な分布イメージを得ること (例えば、細胞管における酸化および酸化還元ヘモグロビンおよび/もしくは酸素化におけるメラニン色素濃度レベル) や、健康なもしくは他の



特定の組織もしくは細胞からガン部を区別することである。このような断定は発光分光光学によって得られる信号は、組織を異なるコンポーネントに分類するために用いられることがでる。この方法によればさらに、蛋白質、核酸、水化合物、NADおよびFAD、コラーゲン、エラスチンおよびグリアビ、および細胞および/または組織内の種々の誘導形成物を識別したり、これらの空間的配置やネットワークを作成可能である。所定の波長の光を用いるとともに、種々のアルゴリズムにより解析することにより、組織内もしくは細胞のアルカリ度もしくは酸度、組織内における腫瘍の存在のみならず出血等も検知したり、その分布やネットワークを得たり、特性付けを行ったりすることができ、検出感度は、種々の蛍光タグを用いて高めることができ、これらのタグは、細胞内およびもしくは組織レベルにおいて悪性度を判定するために用いられることがでる。このため、この方法はガン診断および臨床治療の分野で最も急速に発展している。生体やサンプルからの発光光を検出するための革新的なシステムは世界中で様々なものが知られている。今日、医学分野でのキーとなるものは、これら診療検知システムから得られる信号および画像をどのように解析するかという点であり、本報ではこの点に関するものである。

このように低侵襲診断および治療用技術に上述のような制限のある生物学的研究用の分光生化学分析法の必要性が広く認識されており、この方法を有することは非常に利点が多く、この方法によれば、組織の空間構成を体出したり、細胞および組織構成を形成フローおよび細胞の定量的および有意義な表示したりすることによって、光透過、反射、散乱および蛍光分光法を用いて行うことができる。

本報明においては、生物学的な研究、医学診断および治療用の分光撮像方法を得ることができ、この方法を以下において、は分光生物撮像方法と称する。本報明に係る方法では、空間的な構成（すなわち、分布）を抽出したり、細胞および組織の自然組成、構造、器官および両位体（レセプター・ネuron）（例えば、感光レセプター）のようないくつかのレセプター・ネuronと、並びに光透過、反射、散乱および吸収を利用する原理を、高い空間分解能の分光撮像方法で計量したりするために用いることができる。

後置の光学系に於ける厚みより其光路における等価に  
なれば、分光生物顕微鏡の方法、(a) 分光光像されるべき  
サンプルを照射する工程、(b) そのサンプルを光學接  
面を通して観察する工程、この光學装置は複色分光計に  
光學結合されており、光學装置および複色分光計は、  
(1) コリメート光學要素を用いたコリメートの全ビネ  
ルから入射光を同時に收集し、(ii) コリメートの全ビ  
入射光を多数の要素を有する干渉計系に渡し、また、光  
が干渉計内部で異なる方向に透過する2つのコヒーレ  
ント光線に分割され、次いで2つのコヒーレント光線が

再び給されて互いに干渉して出射光線が形成されるようにし、(iii) 出射光線を、待出器要素の2次元アレーを有する待出器上に出射光線を収束させる収束光学系に通し、各時点で作出器要素の各々がサンプルの1つで、全測期間を通じて常に同一のビクセルであり、サンプルの実像は待出器アレー面上で固定され、測定のための時点では検出可能であり、各待出器要素要素は、異なる波長でビクセルから検出される光の強度の特定の一次結合である信号を生成するように、この一次結合は瞬時光路差の関数とし、(iv) 干渉系系の少なくとも2つの要素を回転し、干渉系系によって生成されたビクセルについて同時に走査されるように、(v) 配鏡装置を用いて各待出器要素の信号を時間の関数として配鏡し、デュータの第1のキュー（立方形）を形成することによってサンプルの各ビクセルのサンプルを得るためのものである、および (c) 数値フーリエ変換を用いて第1のキューを解釈する工程を含む、

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、この方法はさらに (d) 解釈されたデュータのキューをフーリエ変換する工程を含んでもよい、

後述の本發明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記光学装置は、顕微鏡、カメラレンズ、内視鏡、眼底カメラおよび眼底鏡からなるグループから選択される。

後述の本邦明に所収の好ましい実施例における特徴によれば、前記顕微鏡は、反折顕微鏡、透過顕微鏡、蛍光顕微鏡、直立（縦型）顕微鏡、倒立顕微鏡、暗視野顕微鏡、コンフォーカル顕微鏡、定在波コンフォーカル顕微鏡および反折コントラス顕微鏡からなるグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施態様における特徴によれば、前記平行光は、サンプルからの透過光、サンプルからの反射光、サンプルからの散乱光およびサンプルからの発光光からなるグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、サンプリングからの前記発光光は、投与プロパダ光、投与プロパダ励起光および自己発光のグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施態例における特徴によれば、光源から生成される前記光は、レーザー、白色光、フイルター透過光、紫外光および短波長レンジの光のグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記光は複数の光源から生成され、これら光源は同時にもしくは順次作動される。

ダイナミックレンジCCD、増感CCDもしくは時間ゲート増感CCDのようなCCDからなる。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、サンプルは細胞、組織および微生物からなるグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記細胞および組織は人体から採取される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記細胞は、例えば、Rap染色により集められた細胞、血液細胞、胎児細胞、悪性腫瘍の疑いのある細胞、分裂休止期の細胞、有糸分裂中細胞および還元分裂中細胞である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記組織は、網膜、網膜血管、脈管、皮膚、角膜、髪、肺、胃、腸、膀胱、結腸、前立腺、頸部、動脈、静脈および心臓からなるグループから選択される。

れば、前記サンゾルが精膜であり、前記方法が、精膜血管における酸化および脱炭化ヘモグロビンの検出および／もしくはは精膜のメラニン色素は普レベルの検出用である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴により、前記サンブシグが細胞、組織の一部および微生物からなるグルーブから選択され、前記光がグルーブにより照射され、このグルーブは特定の細胞成分に結合され、前記方法は細胞成分の存在もしくはそのレベルの検出用である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記フローは共役蛍光部分を含み、前記励起が蛍光部分の蛍光光である。

後述の本発明に係る好ましい実施態様における構造によれば、前記アロートがさらに核酸分子を含み、前記方法が、この核酸分子と交配する補配核酸（デオキシリボ核酸）をおよび／もしくはリボ核酸）の存在もしくはそのレベルの検出用である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記フローが抗体を含み、前記方法が、この抗体により認識される細胞蛋白質の存在もしくはそのレベル検出である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記蛍光部分が例えば、SpectrumOrange<sup>TM</sup>, SpectrumGreen<sup>TM</sup>, Aqua, Texas-Red, FITC, ローダミン、フルオレスセイン、カスケードブルーおよびこれらの組み合わせである。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記数学的アルゴリズムが、サンプリングの各ピクセルのスペクトルのポイントオペレーション解析である。

れば、前記ポイントオベレーション解析が、サンダルにおける各ピクセルのスペクトルを変形関数に基づいてスカラーマップシフトすることを含む。

れば、前記ポイントオベレーション解析が、サンブルにおける各ピクセルのスペクトルを変形関数に基づいて別のスペクトルにマッピングすることを含む。

後述の本稿明に係る好ましい異議例における特徴に  
れば、前記数学的アルゴリズムが形造学解析であり、これ  
の形造学解析が類似マツピンダのようなスベクトル解析  
に就いて行われる。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記数学的アルゴリズムが類似マッピング解析であり、これによりサンプルの各ビクセルにおける参照ベクトルからのスベクトル差を計算する。

れば、前記類似ソビエトダ解析がグルイエールもしくは、  
 類似からイメージを作り出し、ここでは明るいビジュアルが小さなスベクトル盤に対応し、暗いビジュアルが大きなスベクトル盤に対応する。

れば、前記図例のツピンダ解析がグレイレベルもしくは疑似カラーイメージを作りだし、ここでは明るいピクセルが大きなスベグトル量に対応し、暗いピクセルが小さなスベグトル量に対応する。

後述の本場明に際する好ましい異國風における特徴に  
れば、前記スベクトル差が、各ピクセルのスベクトルと  
参照スベクトルとの差の絶対値を所定長さレンジにおい  
て積分して定義されるスカラである。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記数学的アルゴリズムが分群マッピング解析であり、これにより、各ビタセルのスベクトルにおけるいくつかの参照スベクトルからのスベクトル差を計算する。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記分類マッピング解析が疑似カラーイメージを作り出し、このイメージにおいていくつかの参照スペクトルの一つに対して所定最大スペクトル差を有する一群のピクセルが所定疑似カラーにより着色される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記スベクトル差が、各ピクセルのスベクトルと前記いくつかの参照スベクトルの一つの差の絶対値を平均定数長レンジにおいて積分して定義されるスカラである。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記数学的アルゴリズムが主要コンポーネント折である。

後述の本発明に係る好ましい実施態様における特徴に  
よれば、前記主成分ネットワーク解析が、(a)全測定ビ  
タールおよび遊離糖が用いられるときに

は励起光源の波長を含む、の共変マトリクスを構築し、  
(b) この共変マトリクスを対角化するとともに金直交  
スベクトルベースエレメントを見つけたし、(c) どの  
ベースエレメントがサンゾルの所定特徴を有するかを探索

し出すようになっている。

後述の本發明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記数論的アルゴリズムが一次結合解析である。後述の本發明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記一次結合解析が、前記第1のnスベクトルキューアデータおよび前記第2のnスベクトルキューアデータに属する一対の対応ビタセルの対応位置間、乗積演算を適用して、第3nスベクトルキューアデータを求めるようになっている。

後述の本邦明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記一次結合解析は、二つのスベクトルキューブデータの平均演算、時間変化追跡およびスベクトル正規化からなるグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記一次結合解析は、算術関数によって各ビタセルのスペクトル波長の全てに所定スカラーを与えるものであり、この算術関数は加算、減算、乗算、除算およびこれらの組み合わせからなるグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記一次結合解析はバックグラウンドの除去に用いられ、サンプリングのバックグラウンド部に位置するピクセルのスペクトルがサンプリングのピクセルのスペクトルから引き去られる。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記一次結合解析が校正処理に用いられ、サンプリング頻率前に測定されたスベクトルがサンプルのビタセンのスベクトルを除するために用いられる。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記数学的アルゴリズムが光密度解析である。後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記光密度解析が光密度マップである変換メーパを得るものである。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴散によれば、前記数学的アルゴリズムは予め設定された波長レンジを用いてRDSカラーイメージを計算する。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記数学的アルゴリズムはピクセルの各スベクトル用の二つの異なる長さ間の比を算出する。

後述の本項明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記数学的アルゴリズムはビクセルの各スベクトル用の二つの異なる波束間の比を算出し、このように算出された比に応じて、各ビクセルを明色もしくは暗色の人口色で着色する。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、本方法は、サンプルに投与された多重蛍光標識体のスベクトル特定を行うために用いられる。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、本方法は、サンプルにおける局所的な電位、特にペルおよび細胞間のイオン集中などのようなミクロな環境変化を検出するために用いられる。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、本方法は、サンプル内の葉緑素、カルブダイオンおよび／もしくは細胞質蛋白のような自然成分からの自己蛍光を測定するために用いられる。

後述の本発明に係る好ましい実施

れば、本方法は、生物学研究、薬品開発産業、病理学における細胞染色、組織分類、血液学、尿中のタンパク質の存在確認、染色体分類での遺伝子識別およびマッピング、遺伝子発現、細胞器富集解析学および生化学、細胞核におけるクロマチン分配および機能、細胞質富集および成分マッピング、核皮膜マッピング、皮膚癌のマッピング、黒色腫およびほかの癌の識別、ポロイオン伝導、および光力学的治療の前、間および後の表面像作成からなる用途グループから選択される用途のために用いられる。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記細胞質成分はMD、MDH、フラビンおよびチトクロームからなるグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、本方法は、サンゾルにおける少なくとも二つの蛍光間の空間分離を決定する蛍光喚起エネルギー移動を測定するために用いられるが、少なくとも一つの蛍光搬送体はサンゾルに外部から投与される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記サンゾルが細胞、組織および微生物からなるグループから選択され、前記方法はサンゾルにおける細胞および細胞レベル以下の詳細の影響およびアップレンジを行うために用いられる。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記サンゾルはRomanovsky-Griens着色法、Haematoxylin-Eosin着色法およびMay-Grunwald-Giemsa着色法からなるグループから選択された方法により着色される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記細胞レベル以下の詳細は、核におけるクロマチン組織のタイプであり、このタイプは異質染色質および真正染色質からなるグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記サンノルが細胞、組織および微生物からなるグループから選択され、前記方法はサンノルにおける生命プロセスを時間間数としてモニターするために用いられる。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴に  
よれば、本方法は蛍光交配法であり、この方法は、(a)  
少なくとも一つの蛍光染料を用いて少なくとも一つの被

酸分子を特定し、少なくとも一つの蛍光追跡核酸ブロー  
グを得るステップと、(b) 生物サンプリングの細胞核酸と  
前記ブローグとを交配させるステップとを有し、さら  
に、これらステップに就てもしくはこれらステップに  
追加して (a) 少なくとも一つの核酸ブローグと生物サ

特許第3280035号

ソナールの距離検知とを交差させるスラックと、(b) 前記スラックよりも一つのフローを少なく、これらに隣りた材料により決定するスラックとを有し、これらに隣りた材料により決定するスラックとを有し、(c) 蛍光領域を通して生物のスラックが行われる、(c) 蛍光領域を通して生物のスラックを観察するスラック、この蛍光領域は画像分光計に光学的に繋がり、これら蛍光領域および画像分光計は生物がソナールの各ビームのスポットを次のスラックスラックに感して得る、(1) 平行光素を用いて、生物スラックの各ビームからの射出光を同時に集光するスラックとを有する干渉計システムを通過させるスラックと、(2) 干渉計システムに分離され、そして、これら二つの干渉ビームが互いに干渉して再結合され検知ビームが作られる、(3) 干渉ビームを合光光素システムを通してさせて二次元配列の射出エレメントを有する射出器を通してスラックと、なお、これにより、各検知において、各射出エレメントがイメージの一部であり、決定の

全期間において生物サンプリングにおける同一ピクセルとなっており、これにより生物サンプリングの実際のイメージが検出器のアレイの面上で静止され、測定中いつでもこのイメージデータを観測でき且つ認識でき、このため、各検出エレメント間の位置が異なる位置におけるピクセルから射出される光強度の

一次結合である信号を発生し、なお、一次結合は瞬間的な光路差の関数であり、(iv) 干渉計システムの一つもしくは複数の要素を回転させるステッブと、なおこれにより、この干渉計システムによって作られた二つの干渉ビーム間の光路差が、生物サンプルの全ピクセルについて

て同時に連立され、(v) 第1スベクトルキューブデータを形成するために配線装置を用いて時間の関数として各検出エレメントの信号を配線するステップとからなる。最後に、(d) 数学的アルゴリズムを用いて前記第1スベクトルキューブデータを変換するステップを有

し、この数学的アルゴリズムは背景排除および/もしくは分類マッピングシステム用の一次結合である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴に よれば、本方法は細胞分類方法であり、次のステップから

なる。(a) 解所用の細胞スミア(標本)を準備するステップ。(b) 透過顕微鏡により前記細胞スミアを観察するステップは、なお、透過顕微鏡は撮像分光計と光学的に繋がり、透過顕微鏡および分光計は細胞スミアの各ピクセルのスペクトルを次のステップに基づいて得る。

(i) 平行光學系を用いて細胞スミアの金ピクセルからの射出光を同時に集光するステップと、(ii) この射出平行光をたくさんのエレメントを有する干渉計システム

を通過させるステアツプと、なお、これにより、まず干渉計内を異なる方向に流れる二つの干渉ビームに分離され、そして、これら二つの干渉ビームが互いに干渉して再結合され励起ビームが作られる、(iii) この励起ビームを合焦光学システムを通過させて二次元配列の検出

エフェメントを有する抽出器に含無させるランデツツと、なお、これにより、各瞬間において、各抽出エフェメントがイメージの一部であり、判定の全期間において縮短スミアにおける同一ビクセとなり、これにより縮短スミアの実際のイメージが抽出器アレイの面上で止まれ、決定中いつでもこのイメージを観察でき且つ感度でき、このため、各抽出エフェメントが異なる位置におけるビクセルから射出される光強度の一次結合である値を発生し、なお、一次結合は瞬間的な光強度の関数であり、(iv) 干涉計システムの一つもしくは複数の要素を回転させるランデツツと、なおこれにより、この干涉計システムによって作られた二つの干涉ビーム間の光路差が、縮短スミアの全ビクセルについて同時に遮断され、(v) 第1ランベトルキエーデータを形成するための記録線装置を用いて時間の関数として各抽出エフェメントの信号を記録するランデツツとからなる。最後に、(c) 数学的モデルシステムを用いて前記第1ランベトルキエーデータを再構築するランデツツを有する。

本発明によれば、サンプルの各光子（すなわち、ビクセル）から独立して且つ同時に集められたデータの分光分析を可能としているので、従来のものが有するタラシを十分に克服できる。この方法によれば、サンプルの位置を関数とした材料および光子タイプおよび集束度の

情報のみならず、従来の形態学解析(例えば、Kueberber  
による米国特許第, 965, 727号参照) による従来のイメージング  
—ジ情報が見られる。このため、本発明は、光透過、反  
射、散乱および蛍光法を用いて、高い空間およびスベク  
トル解像度で、細胞および組織コンポーネント、構造、

細胞器官、遺伝物質、投与蛍光追跡プローブの空間組織および量の投出を行うことのみならず、細胞および組織内での投与要素の分布投出を行うことができる。本発明のさらなる効果は、分光データの交換が非常にシリアルであることである。本発明のもう一つの効果は、ファイル

ター、格子およびその他の散乱技術による既知のFolig  
はもしくはフーリエ変換光学の多重効果であり、これ  
により、スベクトル計測において高いS/N比での表現が  
可能である。本発明の肝要の部分は多数の数学的アルゴ

リズムであり、このため、データを意味ある方法で数値もしくは表示するためにコンビニユーソフトウエアが必要である。

図面の簡単な説明

以下に本発明について添付の図面を参照して示例的に

図1は、従来の(従来の技術に係る)のスリットタイプ撮像分光計を示す。

図2は、米国特許出願第08/392,019号に於て構成された従来の技術に係る撮像分光計の主要構成を示すブロック図である。

図3は、米国特許出願第08/392,019号に於て構成された撮像分光計に用いられる非可動タイアの干渉計、すなわち干渉計の主要構成を示すブロック図である。

なわち、サグナツク (Sagmac) 干渉計を示す。

図4は、選択スベクトルレートを強調するための疑似RGB (赤、緑および青) 色の定規を示す。各疑似色の強度は、曲線の一つを掛けた後、曲線の下面の面積を積分して計算される。

図5 (a) は、オリンパス顕微鏡 (IMT2) に添付のSpectraCube-5の分光生物画像システムを用いて得られた、プロピディウム (propidium) ヨウ素で着色した細胞の蛍光スベクトルイメージを示し、図5 (b) は、本発明に方法を用いて図5 (a) に示す画像の三つの独立ピクセルからの蛍光スベクトルプロットである。

図6 (a) は、有糸分裂中の細胞の細胞膜染色イメージを示し、分裂細胞はアクリジノオレンジで着色されている。図6 (b) は、細胞のスベクトルイメージを短くするために測定された二つのスベクトルのプロットであり、細胞質領域からの第1のスベクトル (M1) はアクリジノオレンジの単一形状に特徴があり、核領域からの第2のスベクトル (D1) はアクリジノオレンジの二成分形状に特徴がある。図6 (c) は、参照スベクトルとしてアクリジノオレンジの二成分形状のスベクトルを用いて同様なワッペンング解析を行った結果を示す。図6 (d) は、参照スベクトルとしてアクリジノオレンジの単一形状のスベクトルを用いて同様なワッペンング解析を行った結果を示す。

図7 (a) は、*Oedogonium* sp. *algae*からのトータル蛍光光を示し、図7 (b) は、参照スベクトルとして図7 (a) のスベクトルAを用いた同様のワッペンング解析結果であり、図7 (c) は、図7 (a) における他の薄い黄色蛍光スベクトルを用いた同様のワッペンング解析結果であり、図7 (d) は、参照スベクトルとして図7 (a) のスベクトルBを用いて同様のワッペンング解析結果であり、図7 (e) は図7 (a) ~ (d) に示す映像の四つの異なるピクセルからの蛍光スベクトルを示す。

図8 (a) は、血液細胞を着色するためのMay-Grunwald-Giemsa法により着色された血球細胞を示し、図8 (b) は、図8 (a) の細胞の異なる細胞レベル以下の場所 (A~E) を示す。

図9 (a) は、図8 (b) の矢印で示す五つのピクセルからの透過光スベクトルを示し、図9 (b) は、図8 (a) および (b) の細胞の外側で記録された射出光に比較して計算された図9 (a) のスベクトルに対応する吸収スベクトルを示す。

図10は、図9 (a) に示すスベクトルA,B,CおよびD/Eがそれぞれ参照スベクトルとして用いられたときの定量的疑似ワッペンング解析を示す。

図11 (a), 11 (b), 11 (c) および11 (d) は、図12 (a) に示すソクリアシンの四つの異なる場所の蛍光ピクセルスベクトルを示し、生きているソクリアシナが蛍光

顕微鏡 (オリンパスBX2 RC) に添付のSpectraCube™システムによって解析された、ソクリアシ細胞は緑色光 (最大545nmのバンドパス) により励起され、このシステムにより赤色蛍光が測定された。

図12は、細胞膜染色によるソクリアシの蛍光イメージを示し、この解析により、(a) ソクリアシ細胞は緑色光 (最大545nmのバンドパス) により励起され、赤色フィルター (550nm) を通して観測された赤色蛍光を示し、(b) 図11 (a) のスベクトルAに属する疑似ワッペンング解析により、ソクリアシの上部に自然細胞の葉緑体の含有率の高い二つの顕著な領域が見いだされ、これはおそらく細胞核膜及び口嚢を示しており、(c) 細胞核膜の膜にほぼ1ピクセルの空間点 (図11 (a) のスベクトルAを用いたワッペン) が見られ、(d) および (e) 図11 (b), (c) のスベクトルA,Bを用いたワッペンがそれぞれ、同一区域の狭い領域に輪郭を描いて、細胞質の中央部に大きな空間が見られ、(f) 図11 (d) のスベクトルBを用いたワッペンにより、消化物が細胞から抽出される細胞肛門領域が見られる。

図13は、図14に示す二匹の交尾するソクリアシの空間における藻類葉緑体の蛍光スベクトルである。交尾するソクリアシの空間の上部 (1) および下部 (2) の個々のピクセルスベクトルであり、スベクトル (3) は図14 A~Cに示す二つの細胞の中央核膜前におけるピクセルから得られた。

図14A,B,Cは、(a) 二匹の交尾するソクリアシの空間における藻類葉緑体の蛍光を示し、(b) 交尾するソクリアシにおける空間および自然細胞を有する疑似ワッペンイメージ (図13のスベクトルAによるワッペン) を示し、一つの細胞は大きな食物空間を有し、もう一つは小さな空間を有し、これらはそれぞれタイプ1およびタイプII細胞に対応する。(c) 図13の低強度スベクトルがワッペンングに用いられ、細胞の細胞質における反射率を示す。

図15は、葉緑体の進化ステップを示す。

図16 (a) および (b) は、May-Grunwald-Giemsa染色赤芽球細胞の五つの異なる細胞箇所 (すなわち、個々のピクセル) の多重透過スベクトルおよび吸収スベクトルを示す。

図17a, 17b, 17c, 17d, 17e, 17f, 17g, 17h, 17i, 17j, 17k, 17l, 17m, 17n, 17oおよび17pは、RGB (a, e, i, m) イメージと、真正染色質 (b, f, j, n) のスベクトル、異質染色質 (c, g, k, o) のスベクトルから得られた疑似ワッペンング結果と、赤芽球 (a~d)、好塩基性の正常芽球 (e~h)、初熟赤芽球 (i~l) および後熟赤芽球 (m~p) の細胞質コンパートメント (a,b,l,p) のスベクトルから得られた疑似ワッペンング結果とを示す。

図18a, 18b, 18c, 18d, 18eおよび18fは、B-16色素腫細胞における光感受作中の包摂PP蛍光の細胞サイエス以下の局所化を示す。細胞は5~10μmとともに20時間培養さ

れ、400nmの光で励起され、図19a-cのスベクトルを参照スベクトルとする疑似ワッペンング解析を用いて赤色蛍光画像を得て解析された。

図19a, 19bおよび19cは、それぞれ図18a, 18bおよび18cに示した細胞からの4, 4および2の個々のピクセル蛍光スベクトルを示す。

図20aおよび20bは、血清溶媒媒体においてPPとともに培養された黒色腫細胞における外因性PPの蛍光局所化を示し、(a) はoxo-PPとともに培養された後での新鮮な黒色腫部位の赤色蛍光を示し、(b) は (a) と同様細胞に1分の光照射 (4J/cm<sup>2</sup>) を行った後での赤色蛍光分布を示す。

図21a, 21bおよび21cは図20a, 20bの細胞および場所での5分の培養を行った後での細胞の付加イメージの単一ピクセル蛍光スベクトルを示し、(a) は図20aに示す細胞における細胞レベル以下の場所の異なる場所 (すなわち、個々のピクセル) からの五つの単一ピクセルスベクトルを示し、(b) は光照射の後での図20bの細胞からの四つのスベクトルを示し、(c) は場所ごとに5分間の培養を行った後での細胞レベル以下の箇所からの四つのスベクトルを示す。

図22は、ゾウキヤソクララ蛍光ワッペンングの三つのランダムなピクセルのスベクトルグラフであり、671nmに蛍光ピークを有する。

図23A, 23B, 23C, 23D, 23Eおよび23Fにおいて、A,CおよびEは正規化前の三つのサンゴの多重ピクセル蛍光ワッペンを示し、B,DおよびFは蛍光強度に正規化して、654nmから685nmの間で、それぞれA,CおよびEの蛍光イメージに示されたトランスマットに比べて、正規化された三次元図であり、AおよびBは*Favites halicora*で、CおよびDは*Goniastrea retiformis*であり、EおよびFは*Millepora dichotoma*である。

図24a, 24bおよび24cは、共生体 (a) *Favites halicora*, (b) *Goniastrea retiformis*, (c) *Millepora dichotoma*に隣接するピクセルに対する蛍光強度の回帰曲線を示し、いくつかの放射トランスマットに沿った同一距離に見られるピクセルから測定した平均値が示され、第1ポイントと第5ポイントとの距離が2.4mmであり、線形が±5.5%であり、線形が回帰曲線であり、回帰結果は*Favites halicora*が $r^2=0.905$ であり、*Goniastrea retiformis*が $r^2=0.066$ であり、*Millepora dichotoma*が $r^2=0.062$ である。

図25a, 25bおよび25cは、三つのサンゴ (a) *Favites halicora*, (b) *Goniastrea retiformis*, (c) *Millepora dichotoma*のスベクトル疑似ワッペンを示し、全ピクセルが蛍光を有する環境ピクセルと比較されている。類似性がグレイスケールで示され、明るいピクセルが高い類似性を有し、暗いピクセルは低い類似性を有する。

図26a, 26bおよび26cは、Texas-Red and Rhodamineに添付の二つの異なるフローを用いて行われた休止期I

SIを示し、(a) は顕微鏡を介して観察されるオリジンイメージを示し、(b) は本発明に係る方法によって測定されて処理された後の同一サンプリングイメージを示し、(c) は、Texas-Red and Rhodamine蛍光検出体による蛍光スベクトルを示す。

図27a, 27bおよび27cは、異なる蛍光検出体により区別された六つの異なるフローを用いて行われた休止期I SIを示し、(a) は顕微鏡を介して観察されるオリジンイメージで、細胞はDAPIにより着色されており、(b) は本発明に係る方法によって測定されて処理された後の同一サンプリングイメージを示し、(c) は六つの蛍光検出体の蛍光スベクトルである。

図28は、Papainolysin (すなわち、Papase) で一般的に用いられるようにHaematoxylin-Eosin染色細胞の細胞イメージを示し、A~Fが付けられた細胞がH PV (human Papilloma virus) 癌性頸部細胞であり、B~Fが付けられた細胞が正常頸部細胞であり、C,DおよびEは多形核細胞、鱗状細胞の核およびA~F細胞の細胞質を示す。

図29は、図28a, 28b, 28c, 28d, 28e, 28f, 28g, 28h, 28i, 28j, 28k, 28l, 28m, 28n, 28o, 28p, 28q, 28r, 28s, 28t, 28u, 28v, 28w, 28x, 28y, 28z, 28aa, 28ab, 28ac, 28ad, 28ae, 28af, 28ag, 28ah, 28ai, 28aj, 28ak, 28al, 28am, 28an, 28ao, 28ap, 28aq, 28ar, 28as, 28at, 28au, 28av, 28aw, 28ax, 28ay, 28az, 28ba, 28bb, 28bc, 28bd, 28be, 28bf, 28bg, 28bh, 28bi, 28bj, 28bk, 28bl, 28bm, 28bn, 28bo, 28bp, 28bq, 28br, 28bs, 28bt, 28bu, 28bv, 28bw, 28bx, 28by, 28bz, 28ca, 28cb, 28cc, 28cd, 28ce, 28cf, 28cg, 28ch, 28ci, 28cj, 28ck, 28cl, 28cm, 28cn, 28co, 28cp, 28cq, 28cr, 28cs, 28ct, 28cu, 28cv, 28cw, 28cx, 28cy, 28cz, 28da, 28db, 28dc, 28dd, 28de, 28df, 28dg, 28dh, 28di, 28dj, 28dk, 28dl, 28dm, 28dn, 28do, 28dp, 28dq, 28dr, 28ds, 28dt, 28du, 28dv, 28dw, 28dx, 28dy, 28dz, 28ea, 28eb, 28ec, 28ed, 28ee, 28ef, 28eg, 28eh, 28ei, 28ej, 28ek, 28el, 28em, 28en, 28eo, 28ep, 28eq, 28er, 28es, 28et, 28eu, 28ev, 28ew, 28ex, 28ey, 28ez, 28fa, 28fb, 28fc, 28fd, 28fe, 28ff, 28fg, 28fh, 28fi, 28fj, 28fk, 28fl, 28fm, 28fn, 28fo, 28fp, 28fq, 28fr, 28fs, 28ft, 28fu, 28fv, 28fw, 28fx, 28fy, 28fz, 28ga, 28gb, 28gc, 28gd, 28ge, 28gf, 28gg, 28gh, 28gi, 28gj, 28gk, 28gl, 28gm, 28gn, 28go, 28gp, 28gq, 28gr, 28gs, 28gt, 28gu, 28gv, 28gw, 28gx, 28gy, 28gz, 28ha, 28hb, 28hc, 28hd, 28he, 28hf, 28hg, 28hi, 28hj, 28hk, 28hl, 28hm, 28hn, 28ho, 28hp, 28hq, 28hr, 28hs, 28ht, 28hu, 28hv, 28hw, 28hx, 28hy, 28hz, 28ia, 28ib, 28ic, 28id, 28ie, 28if, 28ig, 28ih, 28ii, 28ij, 28ik, 28il, 28im, 28in, 28io, 28ip, 28iq, 28ir, 28is, 28it, 28iu, 28iv, 28iw, 28ix, 28iy, 28iz, 28ja, 28jb, 28jc, 28jd, 28je, 28jf, 28jg, 28jh, 28ji, 28jj, 28jk, 28jl, 28jm, 28jn, 28jo, 28jp, 28jq, 28jr, 28js, 28jt, 28ju, 28jv, 28jw, 28jx, 28jy, 28jz, 28ka, 28kb, 28kc, 28kd, 28ke, 28kf, 28kg, 28kh, 28ki, 28kj, 28kl, 28km, 28kn, 28ko, 28kp, 28kq, 28kr, 28ks, 28kt, 28ku, 28kv, 28kw, 28kx, 28ky, 28kz, 28la, 28lb, 28lc, 28ld, 28le, 28lf, 28lg, 28lh, 28li, 28lj, 28lk, 28ll, 28lm, 28ln, 28lo, 28lp, 28lq, 28lr, 28ls, 28lt, 28lu, 28lv, 28lw, 28lx, 28ly, 28lz, 28ma, 28mb, 28mc, 28md, 28me, 28mf, 28mg, 28mh, 28mi, 28mj, 28mk, 28ml, 28mn, 28mo, 28mp, 28mq, 28mr, 28ms, 28mt, 28mu, 28mv, 28mw, 28mx, 28my, 28mz, 28na, 28nb, 28nc, 28nd, 28ne, 28nf, 28ng, 28nh, 28ni, 28nj, 28nk, 28nl, 28nm, 28nn, 28no, 28np, 28nq, 28nr, 28ns, 28nt, 28nu, 28nv, 28nw, 28nx, 28ny, 28nz, 28oa, 28ob, 28oc, 28od, 28oe, 28of, 28og, 28oh, 28oi, 28oj, 28ok, 28ol, 28om, 28on, 28oo, 28op, 28oq, 28or, 28os, 28ot, 28ou, 28ov, 28ow, 28ox, 28oy, 28oz, 28pa, 28pb, 28pc, 28pd, 28pe, 28pf, 28pg, 28ph, 28pi, 28pj, 28pk, 28pl, 28pm, 28pn, 28po, 28pp, 28pq, 28pr, 28ps, 28pt, 28pu, 28pv, 28pw, 28px, 28py, 28pz, 28qa, 28qb, 28qc, 28qd, 28qe, 28qf, 28qg, 28qh, 28qi, 28qj, 28qk, 28ql, 28qm, 28qn, 28qo, 28qp, 28qq, 28qr, 28qs, 28qt, 28qu, 28qv, 28qw, 28qx, 28qy, 28qz, 28ra, 28rb, 28rc, 28rd, 28re, 28rf, 28rg, 28rh, 28ri, 28rj, 28rk, 28rl, 28rm, 28rn, 28ro, 28rp, 28rq, 28rr, 28rs, 28rt, 28ru, 28rv, 28rw, 28rx, 28ry, 28rz, 28sa, 28sb, 28sc, 28sd, 28se, 28sf, 28sg, 28sh, 28si, 28sj, 28sk, 28sl, 28sm, 28sn, 28so, 28sp, 28sq, 28sr, 28ss, 28st, 28su, 28sv, 28sw, 28sx, 28sy, 28sz, 28ta, 28tb, 28tc, 28td, 28te, 28tf, 28tg, 28th, 28ti, 28tj, 28tk, 28tl, 28tm, 28tn, 28to, 28tp, 28tq, 28tr, 28ts, 28tt, 28tu, 28tv, 28tw, 28tx, 28ty, 28tz, 28ua, 28ub, 28uc, 28ud, 28ue, 28uf, 28ug, 28uh, 28ui, 28uj, 28uk, 28ul, 28um, 28un, 28uo, 28up, 28uq, 28ur, 28us, 28ut, 28uu, 28uv, 28uw, 28ux, 28uy, 28uz, 28va, 28vb, 28vc, 28vd, 28ve, 28vf, 28vg, 28vh, 28vi, 28vj, 28vk, 28vl, 28vm, 28vn, 28vo, 28vp, 28vq, 28vr, 28vs, 28vt, 28vu, 28vv, 28vw, 28vx, 28vy, 28vz, 28wa, 28wb, 28wc, 28wd, 28we, 28wf, 28wg, 28wh, 28wi, 28wj, 28wk, 28wl, 28wm, 28wn, 28wo, 28wp, 28wq, 28wr, 28ws, 28wt, 28wu, 28wv, 28ww, 28wx, 28wy, 28wz, 28xa, 28xb, 28xc, 28xd, 28xe, 28xf, 28xg, 28xh, 28xi, 28xj, 28xk, 28xl, 28xm, 28xn, 28xo, 28xp, 28xq, 28xr, 28xs, 28xt, 28xu, 28xv, 28xw, 28xx, 28xy, 28xz, 28ya, 28yb, 28yc, 28yd, 28ye, 28yf, 28yg, 28yh, 28yi, 28yj, 28yk, 28yl, 28ym, 28yn, 28yo, 28yp, 28yq, 28yr, 28ys, 28yt, 28yu, 28yv, 28yw, 28yx, 28yz, 28za, 28zb, 28zc, 28zd, 28ze, 28zf, 28zg, 28zh, 28zi, 28zj, 28zk, 28zl, 28zm, 28zn, 28zo, 28zp, 28zq, 28zr, 28zs, 28zt, 28zu, 28zv, 28zw, 28zx, 28zy, 28zz, 28aa, 28ab, 28ac, 28ad, 28ae, 28af, 28ag, 28ah, 28ai, 28aj, 28ak, 28al, 28am, 28an, 28ao, 28ap, 28aq, 28ar, 28as, 28at, 28au, 28av, 28aw, 28ax, 28ay, 28az, 28ba, 28bb, 28bc, 28bd, 28be, 28bf, 28bg, 28bh, 28bi, 28bj, 28bk, 28bl, 28bm, 28bn, 28bo, 28bp, 28bq, 28br, 28bs, 28bt, 28bu, 28bv, 28bw, 28bx, 28by, 28bz, 28ca, 28cb, 28cc, 28cd, 28ce, 28cf, 28cg, 28ch, 28ci, 28cj, 28ck, 28cl, 28cm, 28cn, 28co, 28cp, 28cq, 28cr, 28cs, 28ct, 28cu, 28cv, 28cw, 28cx, 28cy, 28cz, 28da, 28db, 28dc, 28dd, 28de, 28df, 28dg, 28dh, 28di, 28dj, 28dk, 28dl, 28dm, 28dn, 28do, 28dp, 28dq, 28dr, 28ds, 28dt, 28du, 28dv, 28dw, 28dx, 28dy, 28dz, 28ea, 28eb, 28ec, 28ed, 28ee, 28ef, 28eg, 28eh, 28ei, 28ej, 28ek, 28el, 28em, 28en, 28eo, 28ep, 28eq, 28er, 28es, 28et, 28eu, 28ev, 28ew, 28ex, 28ey, 28ez, 28fa, 28fb, 28fc, 28fd, 28fe, 28ff, 28fg, 28fh, 28fi, 28fj, 28fk, 28fl, 28fm, 28fn, 28fo, 28fp, 28fq, 28fr, 28fs, 28ft, 28fu, 28fv, 28fw, 28fx, 28fy, 28fz, 28ga, 28gb, 28gc, 28gd, 28ge, 28gf, 28gg, 28gh, 28gi, 28gj, 28gk, 28gl, 28gm, 28gn, 28go, 28gp, 28gq, 28gr, 28gs, 28gt, 28gu, 28gv, 28gw, 28gx, 28gy, 28gz, 28ha, 28hb, 28hc, 28hd, 28he, 28hf, 28hg, 28hi, 28hj, 28hk, 28hl, 28hm, 28hn, 28ho, 28hp, 28hq, 28hr, 28hs, 28ht, 28hu, 28hv, 28hw, 28hx, 28hy, 28hz, 28ia, 28ib, 28ic, 28id, 28ie, 28if, 28ig, 28ih, 28ii, 28ij, 28ik, 28il, 28im, 28in, 28io, 28ip, 28iq, 28ir, 28is, 28it, 28iu, 28iv, 28iw, 28ix, 28iy, 28iz, 28ja, 28jb, 28jc, 28jd, 28je, 28jf, 28jg, 28jh, 28ji, 28jj, 28jk, 28jl, 28jm, 28jn, 28jo, 28jp, 28jq, 28jr, 28js, 28jt, 28ju, 28jv, 28jw, 28jx, 28jy, 28jz, 28ka, 28kb, 28kc, 28kd, 28ke, 28kf, 28kg, 28kh, 28ki, 28kj, 28kl, 28km, 28kn, 28ko, 28kp, 28kq, 28kr, 28ks, 28kt, 28ku, 28kv, 28kw, 28kx, 28ky, 28kz, 28la, 28lb, 28lc, 28ld, 28le, 28lf, 28lg, 28lh, 28li, 28lj, 28lk, 28ll, 28lm, 28ln, 28lo, 28lp, 28lq, 28lr, 28ls, 28lt, 28lu, 28lv, 28lw, 28lx, 28ly, 28lz, 28ma, 28mb, 28mc, 28md, 28me, 28mf, 28mg, 28mh, 28mi, 28mj, 28mk, 28ml, 28mn, 28mo, 28mp, 28mq, 28mr, 28ms, 28mt, 28mu, 28mv, 28mw, 28mx, 28my, 28mz, 28na, 28nb, 28nc, 28nd, 28ne, 28nf, 28ng, 28nh, 28ni, 28nj, 28nk, 28nl, 28nm, 28nn, 28no, 28np, 28nq, 28nr, 28ns, 28nt, 28nu, 28nv, 28nw, 28nx, 28ny, 28nz, 28oa, 28ob, 28oc, 28od, 28oe, 28of, 28og, 28oh, 28oi, 28oj, 28ok, 28ol, 28om, 28on, 28oo, 28op, 28oq, 28or, 28os, 28ot, 28ou, 28ov, 28ow, 28ox, 28oy, 28oz, 28pa, 28pb, 28pc, 28pd, 28pe, 28pf, 28pg, 28ph, 28pi, 28pj, 28pk, 28pl, 28pm, 28pn, 28po, 28pp, 28pq, 28pr, 28ps, 28pt, 28pu, 28pv, 28pw, 28px, 28py, 28pz, 28qa, 28qb, 28qc, 28qd, 28qe, 28qf, 28qg, 28qh, 28qi, 28qj, 28qk, 28ql, 28qm, 28qn, 28qo, 28qp, 28qq, 28qr, 28qs, 28qt, 28qu, 28qv, 28qw, 28qx, 28qy, 28qz, 28ra, 28rb, 28rc, 28rd, 28re, 28rf, 28rg, 28rh, 28ri, 28rj, 28rk, 28rl, 28rm, 28rn, 28ro, 28rp, 28rq, 28rr, 28rs, 28rt, 28ru, 28rv, 28rw, 28rx, 28ry, 28rz, 28sa, 28sb, 28sc, 28sd, 28se, 28sf, 28sg, 28sh, 28si, 28sj, 28sk, 28sl, 28sm, 28sn, 28so, 28sp, 28sq, 28sr, 28ss, 28st, 28su, 28sv, 28sw, 28sx, 28sy, 28sz, 28ta, 28tb, 28tc, 28td, 28te, 28tf, 28tg, 28th, 28ti, 28tj, 28tk, 28tl, 28tm, 28tn, 28to, 28tp, 28tq, 28tr, 28ts, 28tt, 28tu, 28tv, 28tw, 28tx, 28ty, 28tz, 28ua, 28ub, 28uc, 28ud, 28ue, 28uf, 28ug, 28uh, 28ui, 28uj, 28uk, 28ul, 28um, 28un, 28uo, 28up, 28uq, 28ur, 28us, 28ut, 28uu, 28uv, 28uw, 28ux, 28uy, 28uz, 28va, 28vb, 28vc, 28vd, 28ve, 28vf, 28vg, 28vh, 28vi, 28vj, 28vk, 28vl, 28vm, 28vn, 28vo, 28vp, 28vq, 28vr, 28vs, 28vt, 28vu, 28vv, 28vw, 28vx, 28vy, 28vz, 28wa, 28wb, 28wc, 28wd, 28we, 28wf, 28wg, 28wh, 28wi, 28wj, 28wk, 28wl, 28wm, 28wn, 28wo, 28wp, 28wq, 28wr, 28ws, 28wt, 28wu, 28wv, 28ww, 28wx, 28wy, 28wz, 28xa, 28xb, 28xc, 28xd, 28xe, 28xf, 28xg, 28xh, 28xi, 28xj, 28xk, 28xl, 28xm, 28xn, 28xo, 28xp, 28xq, 28xr, 28xs, 28xt, 28xu, 28xv, 28xw, 28xx, 28xy, 28xz, 28ya, 28yb, 28yc, 28yd, 28ye, 28yf, 28yg, 28yh, 28yi, 28yj, 28yk, 28yl, 28ym, 28yn, 28yo, 28zp, 28zq, 28zr, 28zs, 28zt, 28zu, 28zv, 28zw, 28zx, 28zy, 28zz, 28aa, 28ab, 28ac, 28ad, 28ae, 28af, 28ag, 28ah, 28ai, 28aj, 28ak, 28al, 28am, 28an, 28ao, 28ap, 28aq, 28ar, 28as, 28at, 28au, 28av, 28aw, 28ax, 28ay, 28az, 28ba, 28bb, 28bc, 28bd, 28be, 28bf, 28bg, 28bh, 28bi, 28bj, 28bk, 28bl, 28bm, 28bn, 28bo, 28bp, 28bq, 28br, 28bs, 28bt, 28bu, 28bv, 28bw, 28bx, 28by, 28bz, 28ca, 28cb, 28cc, 28cd, 28ce, 28cf, 28cg, 28ch, 28ci, 28cj, 28ck, 28cl, 28cm, 28cn, 28co, 28cp, 28cq, 28cr, 28cs, 28ct, 28cu, 28cv, 28cw, 28cx, 28cy, 28cz, 28da, 28db, 28dc, 28dd, 28de, 28df, 28dg, 28dh, 28di, 28dj, 28dk, 28dl, 28dm, 28dn, 28do, 28dp, 28dq, 28dr, 28ds, 28dt, 28du, 28dv, 28dw, 28dx, 28dy, 28dz, 28ea, 28eb, 28ec, 28ed, 28ee, 28ef, 28eg, 28eh, 28ei, 28ej, 28ek, 28el, 28em, 28en, 28eo, 28ep, 28eq, 28er, 28es, 28et, 28eu, 28ev, 28ew, 28ex, 28ey, 28ez, 28fa, 28fb, 28fc, 28fd, 28fe, 28ff, 28fg, 28fh, 28fi, 28fj, 28fk, 28fl, 28fm, 28fn, 28fo, 28fp, 28fq, 28fr, 28fs, 28ft, 28fu, 28fv, 28fw, 28fx, 28fy, 28fz, 28ga, 28gb, 28gc, 28gd, 28ge, 28gf, 28gg, 28gh, 28gi, 28gj, 28gk, 28gl, 28gm, 28gn, 28go, 28gp, 28gq, 28gr, 28gs, 28gt, 28gu, 28gv, 28gw, 28gx, 28gy, 28gz, 28ha, 28hb, 28hc, 28hd, 28he, 28hf, 28hg, 28hi, 28hj, 28hk, 28hl, 28hm, 28hn, 28ho, 28hp, 28hq, 28hr, 28hs, 28ht, 28hu, 28hv, 28hw, 28hx, 28hy, 28hz, 28ia, 28ib, 28ic, 28id, 28ie, 28if, 28ig, 28ih, 28ii, 28ij, 28ik, 28il, 28im, 28in, 28io, 28ip, 28iq, 28ir, 28is, 28it, 28iu, 28iv, 28iw, 28ix, 28iy, 28iz, 28ja, 28jb, 28jc, 28jd, 28je, 28jf, 28jg, 28jh, 28ji, 28jj, 28jk, 28jl, 28jm, 28jn, 28jo, 28jp, 28jq, 28jr, 28js, 28jt, 28ju, 28jv, 28jw, 28jx, 28jy, 28jz, 28ka, 28kb, 28kc, 28kd, 28ke, 28kf, 28kg, 28kh, 28ki, 28kj, 28kl, 28km, 28kn, 28ko, 28kp, 28kq, 28kr, 28ks, 28kt, 28ku, 28kv, 28kw, 28kx, 28ky, 28kz, 28la, 28lb, 28lc, 28ld, 28le, 28lf, 28lg, 28lh, 28li, 28lj, 28lk, 28ll, 28lm, 28ln, 28lo, 28lp, 28lq, 28lr, 28ls, 28lt, 28lu, 28lv, 28lw, 28lx, 28ly, 28lz, 28ma, 28mb, 28mc, 28md, 28me, 28mf, 28mg, 28mh, 28mi, 28mj, 28mk, 28ml, 28mn, 28mo, 28mp, 28mq, 28mr, 28ms, 28mt, 28mu, 28mv, 28mw, 28mx, 28my, 28mz, 28na,



視野を形成するための2で示す集光光学系を備える。スリット6から出射する光はコリメータレンズ8でコリメートされ、分光散乱源10(例えば回折格子)を通して、様々な波長が分離される。分光散乱源10からの出力は収束レンズ12によって第2に焦点面内の二次元検出器アレイ14に収束される。検出器アレイ14の出力は信号処理装置16に送られる。

図1の従来技術の撮像分光計に示された2次元検出器アレイにおいては、系の運動(例えば矢印13で示すラスタ運動もしくは直線走査)が第1次元に沿った走査を行う。第2次元の走査は系の運動方向に垂直に配されたスリット6によって行われる。したがって、スリット6はアレイ14内の各検出器があらゆる時間において1つのピクセルが単一の波長に露光するように機能することを保証する。これは各ピクセルのスベクトルを分離するために必要である。

従来技術の種および上記で述べたように、図1に示す従来技術の欠点は、光学系2がすべてのピクセルから同時にエネルギーを集めるにも関わらず、1つレームのピクセルの多くは任意の時間には測定されないことである。その結果、所要フレーム時間は有意に増大し、また、もしくはSNR(感度)はこのようなスリットを必要としない系に比べて顕著に低下する。

図2は本願に充分記載されたものとして引用するカビツ等 (Cabbitt et al.) の1995年5月21日出願の米国特許出願08/392,019号に開示された改良型の従来技術の撮像分光計を示すフロー図である。この撮像分光計は本発明の撮像を実施するのに極めて適した構成を有する。すなわち、図2に示す従来技術の撮像分光計は、20次元キヤプ、フローラ24で示される光路差(OPD)発生器もしくは干渉計、フローラ26で示される1次元もしくは二次元検出器アレイ、およびフローラ28で示される信号処理装置およびディスプレイを含む。

系20において重要な要素はOPD発生器もしくは干渉系24であり、これは分析されるべき対象の各ピクセルから出射する光の光強度の所定の一次結合に対応する空間光を出射する。干渉計の出力は検出器アレイ14に収束される。したがって、スベクトル再生に必要なすべての情報を得るため、すべての必要な光学位相は視野のすべてのピクセルについて同時に走査される。対象中のすべてのピクセルのスベクトルはこのようにして撮像情報と同時に収集され、後の分析がリアルタイムで可能となる。

米国特許出願08/392,019号による装置は様々な構成で実施することができ、特に、使用される干渉系は米国特許出願08/392,019号の開示する図面に記載されるように他のミラーと組み合わさることができ、

すなわち、米国特許出願08/392,019号によれば、他の型の干渉計が使用可能である。これらは、上記米国特許

出願にさらに記載されるように、(1) OPDを変化させて光を変調する移動型干渉計、すなわち、走査駆有するフアラリペー型干渉計、(2) 光学集光系からの光線を受容するビームスプリッタおよびスプリッターを有し、光線を2つの経路に分岐するマイケルソン型干渉計、(3) OPDが入力光線の入射角度によって変化する、他の光学手段と結合させることもできるサニヤック型干渉計、および(4) 4つのミラーとビームスプリッタを加えた干渉計を含む。

図3はOPDが入力光線の入射角度によって変化する干渉計を利用する米国特許出願08/392,019号によって構成された撮像分光計を示すものである。光線に対して小さな角度で干渉計に入射する光線はこの角度に対して直線的に変化するOPDを付与される。

図3の干渉計において、全ピクセルにおいて光源30からの光線は光学集光系31によってコリメートされた後、機械的スキャナ32によって走査される。次いで、光はビームスプリッタ33を通して第1の反射鏡、さらに第2の反射鏡33に到達し、後者によって反射されてビームスプリッタ33に戻り、これを通して、収束レンズ36を通過して検出器アレイ37(例えばCCD)に至る。この光線は3、第2の反射鏡35、そして最後に第1の反射鏡34によって反射された光線と干渉する。

1走査の最後で各ピクセルはすべてのOPDで測定され、したがって、対象の各ピクセルのスベクトルはフーリエ変換で再構築される。光線に平行な光線は補償され、光線に対して角度( $\theta$ )を有する光線はビームスプリッタ33の厚さ、その屈折率、および $\theta$ の函数であるOPDを付与される。小さな角度においては、OPDは $\theta$ に比例する。適当な反転および任意深い配列によって、各ピクセルのスベクトルが計算される。

図3の構成において、角度 $\beta$ (図3では $\beta=45^\circ$ )でビームスプリッタに入射する光線はOPD=0で干渉計を通過し、一般角 $\beta=\theta$ で入射する光線は式(1)で与えられるOPDを付与される。

$$\text{OPD}(\beta, \theta, n) = t \left[ (n-1) \sin^2(\beta + \theta) \right] + 1 - (n-1) \sin^2(\beta - \theta) \quad (1)$$

ここで、 $\beta$ はビームスプリッタに対する光線の入射角、 $\theta$ は光軸からの光線の角距離もしくは中心位置に対する干渉計の回転角、 $t$ はビームスプリッタの厚さ、 $n$ はビームスプリッタの屈折率である。

式1によれば、中心角に対して正および負の角度の両方で走査を行うことにより、各ピクセルについて両面インターフェログラムを得ることができ、これによって、相補性の情報を促進し、より正確なフーリエ変換計算が可能になる。走査距離により到達最大OPDが決定されるが、これは測定分光解像度に関連する。一方、角度差デフズの大きさは系が感度を有する最短波長によって決定される。実際にサンプリング理論 [Camberlain (1979), The Principles of Interferometric Spectroscopy

John Wiley and Sons, 63~65ページ参照]によれば、このOPDデフズは系が感度を有する最短波長の半分未満でなければならない。

考慮すべきもう1つのパラメータはフアラリツス中の検出器要素の微小寸法である。収束光学系を通して、要素は干渉計中に微小なOPDを画定し、これによってインテラエログラムを矩形関数で畳み込む効果を生ずる。この結果、最短波長において系の感度が低下し、要素によって画定されたOPD以下の波長についてはゼロまで低下すること、すなわち、干渉計の検出器要素によって画定されるOPDが感度を有する最短波長よりも小さいことを保証しなければならない。

したがって、米国特許出願08/392,019号に開示された発明に従って構成された撮像分光計は単に視野内の各ピクセルから入射する光の強度を測定するだけでなく、所定の波長範囲における各ピクセルのスベクトルをも測定する。また、これらは任意の時間において視野内の各ピクセルに適用される。

表1:

特性	性能
空間解像度	3.0/Mμm (M=顕微鏡もしくは全光学要素の有効倍率)
視野	8/Mmm
感度	2.0ミルリツクス (積分時間1.00m.s.e. cに對するものであり、積分時間が長くなるにつれてVTに對して直線的に増大する)
分光範囲	4.00~100.0nm
分光解像度	4.0.0nmで4nm (8.0.0nmで1.6nm)
取得時間	5~5.0秒。典型的には2.5秒
FFT処理時間	2.0~1.8.0秒。典型的には6.0秒

スベクトラキエーアシステムは、例えばC-アウトラ

もしくはフーワウントコマタを介して容易にあるゆる顕微鏡もしくはフクロロレンズに取り付けられ、測定中はあらゆる向きに配することができ、また、このシステムは他の拡大手段および様々な型の内視鏡およびカメラに接続することができ、したがって、細胞および組織の分光線を様々な倍率および照明法で得ることができ

クセルによって出射されたすべての光線をより良く利用し、したがって、上述のように、フレーム時間の顕著な減少および/または分光計感度の顕著な増大を可能にする。このような撮像分光計は様々な型の干渉計および光学集光および収束系を含むことができ、したがって、医療診断および治療および生物学的研究用途、地質学的および農業的調査のための遠隔探査等の広範な様々な用途に使用することができ、

米国特許出願08/392,019号に開示される発明による撮像分光計はイスラエル国ミグダヘルベク、インダストリアル・バーグのスベクトラル・ダイアグノスティクス(SD)社(Spectral Diagnostics Ltd, Industrial Park Migdal Haemek, Israel)によって開発されたものである。以下、スベクトラキエーア(SpectraCube)と称する。様々な光学器具に光学的に接続されたスベクトラキエーアシステムは本発明の方法を実施するために使用された。スベクトラキエーアシステムは表1に示すような特性を有する。

る。

45 分光線の表示および分析

a. 一般論  
上述のように分光線は、分光情報と像の空間機構とを組み合わせる3次元のデータレイアウト(3D)である。このため、分光線はその表示性から分光キエーアと称される1組のデータであり、これは他の手段では得ること

が困難で場合によっては不可能である特性の抽出および量の評価を可能にするものである。分光学およびデジタル画像分析は莫大な量の文献[例えば、Jain (1989), Fundamentals of Digital Image Processing, Prentice-Hall Internationalを参照]によって普及されているため、以下の説明は主として単一のデータセット、すなわち分光キューブに分光および画像情報を組み合わせることの利点に絞っている。

分光キューブの可能な分析型の1例は分光および空間データを別々に用いること、すなわち、分光アルゴリズムを分光データに、2次元画像処理アルゴリズムを空間データに適用するものである。

分光アルゴリズムの1例として、各ピクセルでの強度が「類似性」の程度に比例するグレー（もしくは他の色）スケールの像（類似性マップ）を形成する。参照スケールと全ピクセルのスケールとの間の類似性を演算するアルゴリズムを考える。グレースケール像はさらに、所望の特性およびパラメータを抽出するために画像処理およびコンピュータ画像法（例えば、画像強調、パターンの認識等）を用いてさらに分析することができ、学習すれば、類似性マップは参照スケール（ライブラリに予め記憶されたものでも同一もしくは他の分光像のピクセルに属するものでもよい）と分光像の各ピクセルとの差の絶対値の積分を演算し、グレーレベルもしくは偽カラー（白黒もしくはカラー）像を表示するものであり、この像では明るいピクセルが小さな分光差、暗いピクセルが大きな分光差、あるいはその逆にそれぞれ対応する。

同様に、分類マップは類似マップについて配載されたものと同じ計算を行い、表示された像の各ピクセルを、その分類に従って、数値の参照スケールのうちの1つに最も類似した所定の異なる偽カラーでペイントする。

また、非分離演算に基づいた分光像アルゴリズム、す

$$\text{gray\_scale}(x, y) = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} w(\lambda) \cdot I(x, y, \lambda) d\lambda \quad (2)$$

式2において、 $w(\lambda)$  は、すべて適当に重み付けされた像のいくらかの分光領域にわたる積分に各々様々なグレースケール像を算出するための一般的な重み付け応答関数である。例えば、それぞれ赤 (R)、緑 (G)、青 (B) に対する三刺激値応答関数に対応する3つの異なる重み付け関数 ( $w_R(\lambda)$ ,  $w_G(\lambda)$ ,  $w_B(\lambda)$ ) で式 (2) を評価すると、従来のRGBカラー画像を表示することが可能である。また、意味のある新規の (偽) カラー画像を表示することもできる。図4は、この単純なアルゴリズムの「ペイント」を示す1例である。 $I_R$

( $\lambda$ ),  $I_G$ ( $\lambda$ ),  $I_B$ ( $\lambda$ ) を関心のあるスケールの内部に配分されたカラー関数と考えると、この場合に結果として表示される偽カラー画像は重み付け関数に対応

なわち、局所的分光情報および隣接ピクセル間の空間的相関を含むアルゴリズム（これらのアルゴリズムの1つは後述のように主要な分析である）を適用することもできる。

5 分光キューブ（すなわち、 $I(x, y, \lambda)$ ）のようないずれかの3次元 (3D) データを取り扱う際に自然に生じる要求の1つは意味のあるようにデータ構造を可視化することである。断面撮影データ等、例えば共焦点顕微鏡によって得られ、各点が一般に3次元空間の異なる場所 ( $x, y, z$ ) における強度を示す他の型の3Dデータとは異なり、分光像は異なる波長における同一の2次元面（すなわち、ヤンソンの強度を示す像のソーケン）である。このため、データの分光キューブを観察するための2つの最も直感的な方法は像面（空間データ）もしくは1ピクセルまたは1組のピクセルを波長の関数として3次元山谷ディスプレイで観察するものである。一般に、像面はいずれかの単一の波長で測定された強度もしくは各像ピクセルにおいて所望の分光領域にわたって分光分析アルゴリズムを適用した後に得られるグレーレベル像を表示するために用いることができる。分光軸は、一般に、いずれかの所望のピクセル近傍で行われるある種の空間演算（例えばスケールの平均化）の結果として得られるスケール像を表示するために使用することができ、

25 例えば、分光像を、単純な白黒カメラで得ることのできるような像に類似したグレースケール像として、あるいは1つもしくは数種類の人口色を用いて重要な特性を強調もしくはマッピングした多色像として表示することが可能である。このようなカメラはCCTVの分光領域（例えば400nm〜760nm）にわたって光信号を単一の積分器（例えば400nm〜760nm）にわたって白黒CCTVカメラ鏡以下のように分光軸に沿って積分することによって3D分光像データベースから算出することができ、

$$\text{gray\_scale}(x, y) = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} w(\lambda) \cdot I(x, y, \lambda) d\lambda \quad (2)$$

する分光領域中のデータののみが強調され、これら3領域の分光差はより明確に映出できるようになる。

40 b. 点演算

点演算は単一のピクセル（一度に1つより多くのピクセルに隣接しない）演算として定義される。例えば、グレースケール像において、点演算は、所定の変換関数に従って各ピクセルの強度（強度数値）を他の強度にマッピングする演算とすることができ、この型の変換の特定の例は各ピクセルの強度に以下で示される。

点演算の概念は分光像に拡張することができ、ここで、各ピクセルはそれ自身の強度関数（スケール）を、すなわち点元ベクトル  $I(\lambda) : \lambda \in [\lambda_1, \lambda_2]$  を有している。分光像に適用される点演算は各ピクセル

スケールを以下の変換関数によってスカラー（すなわち強度値）にマッピングする演算として定義することができ、

$$v_i = g(w_i(\lambda)) : \lambda \in [\lambda_1, \lambda_2] \quad (3)$$

この型の点演算の1例は式3に従ってグレースケール像を構築するものである。より一般的な場合、点演算は各ピクセルのスケールベクトル（ベクトル）を以下の変換関数に従って、他のベクトルにマッピングする。

$$v_i(\lambda) = g(w_i(\lambda)) : i \in [1, N], \lambda \in [\lambda_1, \lambda_2] \quad (4)$$

$$OD(\lambda) = -\log_{10} \frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)} = -\log_{10} r(\lambda) \quad (5)$$

ここで、 $OD(\lambda)$  は波長の関数としての光学密度、 $I(\lambda)$  は測定されたスケール、 $I_0(\lambda)$  は測定された参照スケール、 $r(\lambda)$  はヤンソンの分光透過率である。式5は、 $I_0(\lambda)$  を (1)  $OD$ が計算されたものと同一の分光キューブ中のピクセル、(2) 第2のキューブ中の対応するピクセル、および (3) ライブラリ由来のスケールから選ばれたものとし、各波長で各ピクセルについて計算される。

光学密度は測定された分光応答性にもCCTV出力器の不統一性にも依存しないことに注目されたい、このアルゴリズムは相対強度をマッピングするのには有用であり、ヤンソンの吸収体の吸収係数およびヤンソンの厚さが既知である場合には、これら吸収体の絶対強度をマッピングするためにも有用である。したがって、以下の請求項に用いられる「レベル」という語は「量」、「相対量」、「絶対強度」および「相対強度」をも意味するものである。

他の例には様々な一次結合分析、例えば、(1) 加算、減算、乗算、除算、およびそれらの組み合わせ等の算術関数によって所定のスケールをピクセル各々のスケールに適用して新たな分光キューブを得、各ピクセルの得られたスケールを第1のキューブの各スケールと選択されたスケールとの合計、差、積、商、およびそれらの組み合わせとするもの、および (2) 所定のスカラーを上述の算術関数によって分光像のピクセルの各々のスケールに適用するものが含まれる。

このような一次結合は、例えば、背景領域に位置するピクセルのスケールをピクセル各々のスケールから減算する積算マッピングおよびピクセル各々のスケールによって測定されたスケールを用いて分光像中のピクセルの各々のスケールを分割する校正工程に用いることができる。

他の例には、グレーレベル画像として比画像計算および表示が含まれる。このアルゴリズムは分光像の各ピクセルについて2つの異なる波長における強度間の比を計算し、これに対応したピクセル各々をより明るいもしくはより暗い人口色でペイントするものである。例えば、比較暗いピクセルはより明るく、比較暗いピクセル

この場合、分光像は他の分光像に変換される。

ここで、点演算の定義は異なる分光像の対応するピクセル間の相関を含むように拡張することができ、この型のアルゴリズムの重要な例は光学密度分析である。光学密度は分光的に調査されている対象の領域を透過スケールよりも高いダイナミックレンジで強調し、図示するためにより用いられる。光学密度は対数演算によって透過に換算し、したがって、正関数である。光学密度と測定されたスケールとの間の関係はランベール-ベールの法則によって与えられる。

15 はより暗く（あるいは逆に）ペイントし、分光強度を有する領域の分布を表示する。

6. 空間分光組み合わせ演算

上述の分光像分析手法のすべてにおいて、アルゴリズムは分光データに適用される。分光的に処理されたデータは画像として表示することの重要性は、主に定量的であり、使用者に有用な画像を提供することにある。しかしながら、その用途によっては、分光像に固有の空間分光相関を利用するアルゴリズムを適用することにより、入手可能な画像データをより意味のあるように用いることも可能である。空間分光演算は分光分析の最も強力な型を代表する。1例として、以下の場合を考える。

25 サンプルは1種類の異なる蛍光体で染色された1種類のセル型を含有している（ここで用いられる「セル」という語は生物細胞および器具の視野内の領域）の双方を意味する。各蛍光体は別個の蛍光線光スケールを有しており、 $k$  種類のセル型のうちの1つのみに結合する。 $k$  種類のセル型の間についてセル当たりの平均蛍光強度を知ることが重要である。この仕事を達成するために、以下の手順、すなわち、(1) 画像中の各ピクセルをそのスケールに従って  $k+1$  のクラス（ $k$  種類のセル型プラス背景）に分類し、(2) 画像を様々なセル型に分割し、各型由来のセル数をカウントし、(3) 各クラスの各々の蛍光エネルギーを合計し、これに対応するクラス由来のセルの総数で除算することからなる手順を用いることができる。

40 この手順は分光および空間データの双方を使用する。関連する分光データは特徴的なセルスケールの形状（すなわち分光「シグネチャ」）を有し、空間データはその多くが目には類似して見える様々な型のセル（すなわち、セルプロファイル）からなる。この型の集合に対して理想的な型の測定は分光像である。上記の場合、セルはそれらの特徴的な分光シグネチャによって区別することができる。よって、適当な点演算を行うことによって、各ピクセルが  $k+1$  の値の1つに割り当てられた人工画像を生成する。異なるセル型の蛍光線光スケールが、 $I(\lambda) : \lambda \in [\lambda_1, \lambda_2]$  として既知であ

り、各ピクセル  $(x, y)$  で測定されたスベクトル  $(s_{ij})$  が  $s_{ij}(\lambda)$ ,  $\lambda \in [\lambda_1, \lambda_n]$  であるとすると、以下のアルゴリズムが可能な分類法 (上記のステップ7) である。

$$o^i = \sum_{\lambda \in R_1} (s(\lambda) - s_i(\lambda))^2 \quad (6)$$

が得られる。ここで、 $R_1$  は既知のある分光領域である。画像の各点 [ピクセル  $(x, y)$ ] は次いで以下の基準を用いて  $k+1$  のクラスの1つに分類することができ

点  $(x, y) \in \text{クラス } k+1$  if  $o^i > \text{閾値}$  (7)  
for 全  $i \in [1, k]$   
但し、点  $(x, y) \in \text{クラス } o$  if  $o^i > \text{閾値}$ ,  $o$  は  $\min [o^i] = o^i$

$$F = \min_{\lambda \in R_1} \sum_{i=1}^k (s(\lambda) - s_i(\lambda))^2 \quad (8)$$

但し、 $s(\lambda) = \sum_{i=1}^k o^i s_i(\lambda)$

$dy/dx = 0$  を  $i=1, 2, \dots, k$  について解く (すなわち、

$$B_{m,n} = \begin{bmatrix} 2 & s_m(\lambda_1) & s_m(\lambda_2) \\ 2 & s_n(\lambda_1) & s_n(\lambda_2) \end{bmatrix} \quad (10)$$

$\lambda \in R_1$

の次元  $k$  の正方行列

$$B = \begin{bmatrix} 2 & s_m(\lambda_1) & s_m(\lambda_2) \\ 2 & s_n(\lambda_1) & s_n(\lambda_2) \end{bmatrix} \quad (11)$$

$\lambda \in R_1$

として定義されるベクトル、が得られる。

算術演算を同時に2つ以上の分光キューブおよび/もしくは所定のピクセルもしくはライブラリ由来のスベクトルに適用することができ、例えば、データの第1の分光キューブおよびデータの第2の分光キューブに属するピクセルに属する対応するピクセル間の対応する波長間で算術演算を適用し、例えば、データの2つの分光キューブの平均化、時間変化のフーリエ変換、分光標準化等の目的でデータの第3の分光キューブを得ることが考えられる。

多くの場合、分光像に存在する対象 (例えばセル) はその化学的構成要素および/もしくは構造が互いにいくらか異なっている。其分岐もしくは相関行列を生成する

$o^i$  をセル型  $i$  に付着した蛍光体の既知のスベクトルからの測定されたスベクトルの偏差とする。この場合、最小2乗された「距離」の定義を採用すると、

ここで、上述のステップ2および3 (画像分割および平均分光強度の計算) は式6および7に記載されたアルゴリズムに従って形成された人工画像上での標準的なコンピュータ画像演算を用いて実行される。

他の方法は各ピクセルで測定された  $s_{ij}(\lambda)$  を  $k$  種の既知のスベクトル  $s_i(\lambda)$  ( $i=1, 2, \dots, k$ ) の一次結合としてして表現するものである。この場合、以下の解となる係数ベクトル  $C = [c_1, c_2, \dots, c_k]$  を得る。

"B (9)、但し、Aは要素

$$s_m(\lambda) = \begin{bmatrix} 2 & s_m(\lambda_1) & s_m(\lambda_2) \end{bmatrix} \quad (10)$$

$\lambda \in R_1$

ことによる主要成分分析を用いると、これらの小さな差が増大する。以下に、其分散行列を用いた主要成分分析を簡単に記載する。主要成分分析に関する詳細についてはMartens and Naes (1989), Multivariate Calibration

35 n, John Wiley & Sons, 英国、およびEsbensen et al., 編 (1994), Multivariate Analysis-in practice, Comp user-aided modeling as CAMO, およびUnscrambler's User's guide, Tondheim, ノルウェーを参照されたい。すなわち、ここで定数  $\lambda_i$  ( $i=1, \dots, N$ ) での画像

40 のピクセルの強度は長さ  $q$  のピクセル数  $q$  に等しいベクトルと考えられる。これらのベクトルが測定波長に対して1個づつ、計  $N$  個あるため、これらベクトルは  $q$  行  $N$  列の行列に配列することができ。

$$B = \begin{bmatrix} B_{1,1} & \dots & B_{1,N} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ B_{q,1} & \dots & B_{q,N} \end{bmatrix} \quad (12)$$

ここで、 $B_{ij}$  は  $i$  行  $j$  列の要素。

$$M_{1,1} = \frac{1}{q} \sum_{i=1}^q B_{i,1} \quad (13)$$

ここで、 $M_{1,1}$  は  $B$  の1行1列の要素の平均。

$$B = \begin{bmatrix} B_{1,1} & \dots & B_{1,N} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ B_{q,1} & \dots & B_{q,N} \end{bmatrix} \quad (14)$$

ここで、 $B_{ij}$  は  $i$  行  $j$  列の要素。

として定義する。

分散行列  $C$  を行列  $B$  に対して次元  $n \times n$  の  $C = B^T \cdot B$  として定義する。  $C$  は対角化し、固有ベクトル  $u_i$  および固有値  $\lambda_i$  ( $i=1, 2, \dots, N$ ) があり、ただし、 $\lambda_i$  は  $N$  個の固有値単位ベクトルであり、 $u_i$  は  $i$  番目の単位ベクトル  $u_i$  の方向における分散を示す固有値である。一般に、最小成分がピクセル間の分散として最大の変動性を示す。

ここで、 $(i=1, \dots, N)$  は直交基底上の要素  $u_i$  上の分光像の射影であり、黒色画像および白色画像として別々に表示することができ、これらの画像は所定の波長でフーリエ変換された通常の白黒画像からは明確に得られない特性を明らかにすることができ、

分光生物画像系は、画像中の化学的構成要素間もしくはは組織にわたる分光差が存在するすべての用途で潜在的に有用である。測定は事実上いかなる光学系を用いても行うことができる。今日存在する最も高度な本発明を使用することのできるこれらの用途は以下の通りである。

(1) 反折顕微鏡、透過顕微鏡、蛍光顕微鏡、垂直倒立顕微鏡、暗視野顕微鏡、共焦点 (正常・定在波共焦点) 顕微鏡、反射コントラスト顕微鏡等を含む様々な型の顕微鏡。これらの校正は生物学的研究、薬物開発、農業、

(臨床的および解剖学的) 病理学における細胞および組織分類、血液学、最近の型を抽出するための成分分析、遺伝子間定および (間期および有糸分裂の中) 染色体におけるコンプレックス、遺伝的変異、細胞オルガネラ解析および生理学、細胞内におけるクロマチン分布および濃度、細胞内コンプレックス、核膜コンプレックス等を使用することができる。

40 (3) 顕微鏡、可塑性もしくは剛性のフレイバ光学要素を含む細胞膜、および肝、腎、肺、筋、結核、前立腺、子宮頸部、動脈、静脈、心臓等、いずれかの体内組織を、例えば、白色光の反射、自動蛍光、およびレーザー誘導蛍光等あらゆる検出モードで、通常および高分解能の両方で、短波長および多波長励起の両方を用いて、撮像するのにより、細胞内組織を含む様々な型の内視鏡。これらの構成の円形内視鏡は診断用の細胞膜コンプレックスおよび病理学および手術前、中、後の外科医のための分析器具、および手術中に病的組織の境界を正確

に可視化するためのものを含む。

(4) 基底部がメラミンもしくは様々な基底組織、すなわち細胞質もしくは他の細胞状態によって引き起こされる変性のようなあらゆる型の細胞疾患を、分析および初期診断器具の両方として、また組織のどの部分が目ざされ、病的監視および組織組織をマッピングするために現在使用されているフルオレセセンス血管造影法の追加物もしくは置換物として、何時治療するかを決定するための治療薬として、マッピングするために用いられるもの。

(11) 組織のレーザ治療中に眼科医が光凝固もしくは切除すべき組織の領域および/もしくは境界を示すための器具とするもの。

上述のように、透過、反射、散乱および蛍光光学における分光生物画像法は多くの実験方法および特定の用途がある。よって、全般に、光のような分析すべき放射線は広範囲の供給源に由来するものとすることができ、例えば、供給源は放射線を自然に放射するものであってもランプもしくは他の照明方法からの放射線を反射し、または透過するものであってもよい。また、UVやレーザー等の適当な照明と共に、また照明波長が検出光計に到達するのを防止する適当な手段と共に、各場合に問題となる単数もしくは複数の対象に関する異なった情報を得るために、蛍光もしくはラマン分光法を測定を行うことができる。

#### 蛍光顕微鏡法

##### a. 一般論

多数の染料の使用 [Jain (1989), Fundamentals of Digital Image Processing, Prentice-Hall International (参照)] は組織および細胞分析器具のうち、最も強力な一般的なもの1つである。したがって、蛍光顕微鏡法は光学顕微鏡に用いられる最も重要な実験方法のうちの1つである [Lakowicz (1983), Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, New York, London]。蛍光プローブのメーカは主として特定の染料が結合する生物学的構造の多様性による [Bergman (1986), Applications of Fluorescence in the Biomedical Sciences, Taylor et al (Ed), New York: Alan R. Liss, Inc., 3~28ページ]。蛍光プローブの詳細な技術については、Mason (編) (1993) Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity, Biological Techniques Series, Sattell Academic Press Limited, London, および Pines and Tanke (1987), Introduction to Fluorescence Microscopy, Oxford University Press, Royal Microscopical Societyを参照されたい。

新技術、より洗練された多色蛍光染料分子の急速な開発により、これらの染料の存在力を充分に利用することのできる、より進んだ蛍光検出技術への要求が形成され続けるであろう。蛍光染料がこれまでで、今後も、現在行われている研究の過程で与えるであろう革命的な貢献についての議論に関しては、Taylor et al (199

2). The New Vision of Light Microscopy, American Scientist, 80巻, 322-335ページを参照されたい。

分光生物画像法は単純なフィルターに基づいた方法に対して、蛍光画像用途にいくつもの重要な利点を提供し、これらの利点は以下のものであろう。(1) 関心のあるサンプル中の染料分子の実際の挙動に対してより多くの定量的知見を提供する完全なスベクトルの測定。(2) 望ましくないバックグラウンド蛍光によって起こる従来の問題の多くを解消する能力。(3) 蛍光プローブの発光スベクトルにそのミクロ環境 (例えば温度) によって生じる望ましくないあるいは予測できない分光シフトを考慮してフロー速度を決定できるが、これに対して、蛍光強度がペンドラムを用いてのみ測定される場合、このような分光シフトは検出されず、フロー速度分析時に顕著な誤差を引き起こす。(4) 蛍光像取得の単純化、そして、以下詳細に述べるように、適当な分光分析アルゴリズムと共に使用される場合、単一の測定で、多くの分光的に重なる蛍光染料を分離かつマッピングすることが可能である。実際に、多数数分析、主要成分分析および他の分類アルゴリズムのような洗練されたデータ分析アルゴリズム (Mathews and Nees (1989), Multivariate Calibration, John Wiley & Sons, Great Britain) を適用することにより、多くの分光的に関連したパラメータを同時に分析することが可能である。

分光生物画像法は、望ましくないバックグラウンド蛍光に関連する問題を解消する手段を提供する。蛍光画像顕微鏡法は典型的には、サンプルが所望の駆動波長で励起されかつプローブの蛍光光線に対する限られた分光帯域の波長のみが検出器 (例えば、眼、カメラ等) に到達するように保証する蛍光フィルターを用いて行われる (Mason (編), Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity, Biological Series, Sattell Academic Press Limited, London)。蛍光強度は通常、励起源よりも数オーダー低いので、このようなバックグラウンド蛍光は完全に排除できない [Benson et al (1986), Cell Biol., 100, 1309-1322ページ]。望ましくないバックグラウンド蛍光の3つの主要な供給源は以下の通りである。(1) シロイソクミラーコンテイングおよび/もしくはフィルターが完全に遮断されない励起源からの放射線、(2) サンプルおよび時には光学要素にも由来する自然蛍光またはバックグラウンド蛍光に等しい。サンプル自然蛍光の効果は通常、吸収および蛍光帯域が測定サンプルのそれらと重ならない蛍光プローブを選択することによって低減することができ

る。同様に、自然蛍光を低減するように適当にチューニングされた光学要素を選択することによっても、(3) 励起フィルタ、シロイソクミラーおよびフィルターの不透明な (もしくは最適でない) 組み合わせ、入手可能な最善のフィルターング方法であっても、望

ましくないバックグラウンド蛍光によって、関連する発光をそのバックグラウンド (ノイズ) から引き出すことはしばしば困難となり、時には不可能となる。一方、分光生物画像法は(1) 蛍光染料の分光形状および分光領域と(2) バックグラウンド蛍光 (自然蛍光を含む) の分光形状および分光領域との間の分光差を用いて、望ましくないバックグラウンド蛍光の効果を除くことができる。

したがって、適当な分光像分析方法を蛍光プローブの発光スベクトルに適用することにより、蛍光画像測定のS/N比、したがって、その精度を向上させることが可能である。結果の定量化が望まれる場合、この分光生物画像法の利点は比画像法に特に重要である。また、分光生物画像法は、フィルターをベースとした測定で最善のフィルターを用いて得たものである。サンプルは水銀光線で照明し、蛍光強度はMCPフィルターキエーン (DM580シロイソクミラー、DS50励起フィルターおよびBP545/40フィルター) を通して検出され、図5bは3つの別個の像のビジュアルに由来する蛍光強度スベクトルをプロットしたものである。3つのスベクトルが各々2つのピークを示していることに着目されたい、623nmのピークは酸化プロピジールの実際の蛍光強度スベクトルによるものであり、775nmの第2ピークは励起もしくはバリアフィルターで完全に排除されなかった励起光の残りに過ぎない、この望ましくないバックグラウンド放射線はさらに別の励起フィルターを添加することによって除去可能である。しかしながら、同じ測定で (PB460フィルターを用いた、非分岐) 検出系で行われたとすると、各ビジュアルで測定された強度は、775nmピークの望ましくない信号の寄与を含む図5bに示したスベクトルの部分に比例することになる、この比率を改善するように、従来のCD像に適用することのできる補正アルゴリズムが存在するが、ノイズを伴う [Benson et al (1985), Cell Biol., 100, 1309-1322ページ]。しかしながら、各ビジュアルでの蛍光を波長の関数として測定する分光生物画像法を用いれば、容易に分析を、関心のある蛍光染料の発光に対応する波長 (例えば623nmピークの周辺) のみに限定し、その結果は図5aに示す像において行われたように、残存する励起の供給源の信号の寄与を除去することにより、本発明の方法による分光生物画像法のバリエーションを適当な蛍光領域と組み合わせることにより、多色蛍光像の取得は大幅に単純化させることができる。分光画像によって得

られる利益を充分に顕微鏡するためには、多数のフローラを含有するサンプルからの蛍光を測定するためにフィルターをベースとする方法を使用する場合の典型的な工程を考えると、まず、互いに充分に異なる吸収および発光スベクトルを有するフローラを選択しなければならぬ。現在、実際には、この要求により、試料中の蛍光領域の数は3ないしは制限される。次いで、励起波長を選択するための1つと発光スベクトルを補正するための1つとからなる2つのフィルターホルンを補正することにより、あるいは、励起波長を選択するための1つのフィルターホルンを補正する一方で3重シロイソクミラーで発光スベクトルを補正することにより、各試料に対して1つずつの蛍光像を得る。(運動部のない) 回収可能なフィルターを用いて励起および/もしくは蛍光波長を制御する方法は提案されている。近年、多分光干渉フィルターを用いて多数の蛍光体を検出することが可能になった [Jengner et al (1993), Human Molecular Genetics 2, 502-512ページ]。(例えばフィルターキエーンを交換することによって) シロイソクミラーを交換する手段も必要である。各波長において像の焦点を再調節することも頻りに必要となり、時には、より高いS/N比を得るために、CDカメラの露光時間さえも代えなければならぬ。この結果得られる、各々異なる蛍光染料の発光に対する白黒画像は次いで顕微鏡色され、(容易に得られる市販ソフトウェアと共にデジタルコンピュータで示す。シロイソクミラーの位置のわずかな変化によってデジタル画像が逆シフトするため、多数重シロイソクミラーの使用 [4重波長ペンドラム特性を有するシロイソクミラーの使用についてはHittmaka et al (1992), Seminars in Cell Biology 第2巻, 163-164ページを参照されたい] または重ね合わせに先立つ画像の位置合わせが必要である。画像位置合わせ法はより一般的であるが、時間がかかり、しばしばわずかに精度の結果を生じるに過ぎない困難な問題である。これらはまた、多色蛍光像を得る際に考慮しなければならぬ技術的課題である [Bergman et al (1989), Part B of Methods in Cell Biology, 第9巻, 17巻, 449-464ページ, Taylor et al (Ed), Academic Press]。

したがって、本発明の分光生物画像方法はフィルターをベースとする方法が蛍光画像に課している基本的制限の1つを克服する。(後述のテキサススレッドおよびローグミン蛍光体の実施例に示されるように発光スベクトルが大幅に重なり合う染料を含む) 無制限の数の蛍光染料の発光スベクトルを同時に測定可能とすることにより、分光生物画像法は多数の蛍光プローブの発光像を同時に得る必要をなくす。使用される蛍光プローブが一般的に励起源で励起可能な場合、分光生物画像法の使用による利点は最大となる。この場合、単一の分光像係数により、ほ



は細胞内の蛍光染料の蛍光発光を捕捉でき、(1) 量なりきりない染料の選択、(2) フluorescenceの交換、(3) 画素もしくは輝度フュージョンの交換、(4) 焦点および/もしくは輝度時間軸の最適化もしくは画像の位置合わせが必要なくなる。もちろん、重点は一般的に供給源で面できる適当な染料を選択することにある。したがって、互いに受容される蛍光エネルギーで固定される染料は、蛍光生物特性を有する染料の最適化である。明らかに、類似した発光特性を有する染料の使用は(例えば細胞膜下における) 視覚検出をより困難にする。しかしながら、この制限は本発明の分光生物検出方法を使用することによって解消される傾向にある。

#### 多量蛍光体の分光固定

本発明による分光生物検出の使用により、数多くの染料(すなわち、蛍光体、蛍光部分)を1回の測定で同時に測定することが可能になる。染料の型にはならぬ制限がなく、分光的に重なり合う染料(例えばローダミンとテキサスレッド)も後述(実施例6参照)のように適当なアルゴリズムを適用することによって固定し、それら出現を画像中にマッピングすることができ、多くの染料を同時に使用する場合、それらの励起波長、蛍光強度および発光スベクトルを注意深く考慮するべきである。これでは適切に行われた場合、結果は定量的に分析することもできる。例えば、数個のタンパク質を、これらに特異的に結合する蛍光標識された適当な抗体を用いて単一の測定においてマッピングすることが可能である。構造的な校正された染料を用いて絶対強度を測定することも可能である。多量蛍光フローの検出が重要な利点となり得る重要な1例はFISH(蛍光インジケーションマイクロアレイ)である[Emmanuel (1993), 'Genetic Genetics and Hormones 9.6-12ページ']であり、これは染色体レベルで遺伝子を分析し、遺伝子増殖、欠落、転移、再配置の遺伝子欠陥の可能性を現示するために用いられる。

多くの癌および出欠欠陥を含む多くの癌および遺伝子は1つ以上の遺伝子欠陥によって引き起こされ、他の多くの癌は遺伝子成分を有すること、すなわち、単独では癌を引き起こさないが、それに寄与し、あるいは生命の後期において癌を進展させる遺伝子欠陥が存在することと知られ、あるいは推測されており、当分野においては、多因性および遺伝子欠陥と呼ばれる現象である。既知の癌と可視遺伝子欠陥との相関によって、医師は明確な診断をし、多くの癌の早期診断および治療を可能にする。遺伝子カウニングは予知される癌や危険性のある個人に将来の潜在的な深刻な問題を警告することができ、適当な介入を可能にするものである。

これまでに5000を超える遺伝子学的固定され、それらの多くは多量遺伝子欠陥と関連づけられている。染色体が遺伝情報を持つ担体であることが発見された後、科学

者は特定の癌の原因となる染色体内の可視欠陥を特定することが可能であると推測した。1960年代にライブラリに展開された有糸分裂染色体の顕微鏡ベースの分類のために染色技術が開発された。数10年におわり、染色体バンド化パターンはヒト遺伝子座と有糸分裂染色体の観察される構造的異常とを相関させるために使用された。染色体は典型的にはギーザ染色(G-bands)化)の後に明視野顕微鏡法で観察されるか、あるいは、蛍光染色後に蛍光顕微鏡法で観察され、長さ方向に沿った特徴的な明視野バンドが明らかにされる。患者のバンド化パターンを正常な染色体のものとは注意深く比較することにより、異常な遺伝子座を引き起こす転移(染色体間もしくは内での遺伝子物質の交換)、欠陥(染色体もしくは染色体片の損失)、追加、反転および他の欠陥のような異常が明らかにされる。

しかしながら、例えば、慢性緑内障(CP)や他の多くのものような多くの深刻な遺伝子座は1つもしくは数個のヌクレオチドのみの追加、欠陥もしくは置換を伴う突然変異によって引き起こされる。このような小さな欠陥は上述の染色体バンド化技術では検出不能であり、多年におわり、細胞遺伝学者は数10年を見いだしたような定量化するための技術を開発しようとしてきた。蛍光インジケーションマイクロアレイ(FISH)は通常25年間に多くの補完的技術の改良によって発展した。その出現は、染色体上の遺伝子座の正確な位置をマッピングするためのより良い器具を開発し、染色体の検出はマッピングできない小さな遺伝子欠陥を検出しようとする細胞遺伝学者の要求によって促されたものである。ヒトの全遺伝子を固定かつマッピングしようとする大規模な計画であるヒトゲノムプロジェクト(HGP)はFISHに関心がある。

必要の多いDNAフローの開発を促進し、また、現在のFISH技術は同時に強力な免疫学的フローの開発、顕微鏡法および分光法用の優れた蛍光染料の種類の増大、および蛍光顕微鏡法に用いられる対物レンズ、照明器およびFISHの劇的な改良によって可能となった。

FISHのパワーおよび有用性は多くの要因による。(1) FISHは分離された染色体および核のみならず、固定されたパラフィン埋め込み細胞切片内の全細胞に対して使用できる。(2) これは比較的小さな欠陥を検出できる(より小さな欠陥を検出する能力は一定して増加している)。(3) これは結果を比較的迅速に提供することができる。(4) その適度な費用により、多くの診断および研究所での使用が可能である。(5) 様々なフローおよび核本型に対する応用が可能である。

(6) 高い特異性および感度。(7) 典型的には2時間である短い処理時間で得ることができる。FISHの多くの用途においては、細胞遺伝学者は顕微鏡の透過レンズもしくはモニタ上の像を観察するだけで、蛍光標識が存在するか否かを決定することができ、いくらかより複雑な標本においては、1つもしくは

2つの着色された標識を単純に数えることができる。しかしながら、デジタル画像を処理し、かつそれらから数量データを抽出することができるといえる能力により、FISH技術には所定可能な可能性が追加される。本発明のような適当な検出方法は、標識された染色体および遺伝子座を明確に固定できるように微細なFISH画像を強化することができ、容易に達成可能な実験条件下で、標識された部位を自動的に数えることが可能である。また、各標識された部位を測定し、DNA量を計算して、例えば、特定の遺伝子の、存在する複製数を明らかにすることもできる。多量FISHのような新規技術はカラー画像分析を用いて多数(3, 4, 5およびそれ以上)の蛍光フローを検出し、定量化する。

上述のように、FISHは標識されたフローの位置、各染色体上の標識された部位の数、および各部位における標識の強度(遺伝子物質の量)に関する情報を提供することができる。動原体(反復DNA)フローは各標識染色体に存在する複製を標識し数えるために用いられる。遺伝子座に特異的なフローは遺伝子物質の小さな位置をマッピングするために使用される。これらの型のフローの双方は既述のタイプの相関後および有糸分裂染色体スプレッドに用いることができ、視覚的に数えることができる。これらは、特定の染色体、染色体断片、もしくは遺伝子の複製を過剰もしくは過小に有することによって特徴づけられる遺伝子座を固定するために慣習的に使用される。ある種の癌の初期段階においては、細胞が異常と認識される前に、特定の遺伝子の数が増大すること、当分野において、遺伝子増殖と呼ばれる現象が起ることがあるが、これは遺伝子座特異性フローの使用によって検出可能である。FISHを用いて癌性細胞中の染色体異常を検出すると、病気が到達した発達段階を指摘し、したがって、その多くの効果段階に対して特異的な、最適な治療を選択することができ、したがって、貴重な時間を節約し、患者の苦痛を最小化し、最も効果的な段階に特異的な治療を選択される。

1つの特定の染色体を(例えばフロー血球計算により)分離することによってその染色体の全表面を均一に標識し、これを(例えば音波処理によって)物理的にもしくは(例えばエンブラスクレープによって)酵素的に切断し、全片に対して1組のフローを発生させることが可能である。全染色体フローは染色体バンドとしても知られており、標識染色体のすべての複製が蛍光標識されるものである。染色体バンドインの重要な用途の1つはあらゆる種の癌で特徴的に起こるような2つの染色体間の欠陥および転移の検出にある。

例えば、染色体Aが特異的に緑のベントで標識され、染色体Bが特異的に赤のベントで標識される場合、AからBへの物質的あらゆる転移は赤い染色体上の緑色領域(あるいは反対)として認められる。典型的には、正常な染色体から発生した染色体ベントを用いて

異常な(患者の)染色体の欠陥もしくは転移を検出する。逆染色体ベントインジケーションは異常な染色体から発生したフローを用いて、異常な染色体に物質を寄与した様々な正常な染色体に由来するDNAを固定する。

比較的小さいマイクロアレイ(CGH)は逆染色体ベントインジケーションの交差であり、染色体の完全な組から2つのDNAフローのカリキュレーションを発生するものである。1つのカリキュレーションは正常な1組の染色体から発生し、他は1組の異常な(例えば腫瘍)染色体から発生する。2つの組のフローは異なるレポーター分子を用い、例えば、正常なDNAが赤い蛍光を示し、異常なDNAが緑の蛍光を示すようにする。正常な分裂中期のスプレッドは両カリキュレーション時にマイクロアレイ化され、カラー画像分析を用いて評価される。赤よりも緑の蛍光が強い正常な染色体領域は、患者の異常な細胞中のその遺伝子でDNA増殖(多数の遺伝子複製)が起きたことを示す。緑よりも赤の蛍光が強い(緑/赤比の低下した)領域は、患者の染色体中の遺伝子欠陥部位を示し、赤と緑の蛍光が同等である領域はその部位でDNAの変化が起らなかったことを示す。CGHおよび関連する技術は従来の標識よりも複雑であるが、従来可能であったよりも、より微細かつ広範囲な遺伝子変化を検出かつ定量化することを可能にするものである。

上記の説明から、後記判定、転移/再配置検出、染色体欠陥/増殖、および遺伝子マッピングが、単純なカラー一重画像の代わりに、比較的高分光解像度で全光像を構成する本発明の感度の高い定量的な分光検出方法によって、大いに利益を得ることがわかる。その理由は、このような方法がサンプリング時間を短縮し、マイクロアレイ化された蛍光フローをバッキングアップに依存するものから(小さな分光シフトによって)区別することとを可能にし、極めて多数のフローを同時に測定することとを可能にするからである。

したがって、本発明の目的の1つは、フロー技術における利点を活用するFISH検出法を提供することにある。本発明によれば、任意の染色体分析において分析可能なフロー数を大幅に増加させ、かつ従来技術の方法に比べて自動化の速度および程度を劇的に向上する。

本発明のFISH検出法はスベクトラキエーション系を適用するものである。単一の実験で顕微鏡視野内の全バンドの位置を検出できるものである。染色体特異性フローおよび新規の標識法が入手することに適応して、これらの方法は異なった色(すなわち、ヒト型型については2色の異なる色)でベントされた各染色体を有するFISH検出法が形成可能である。これらの方法により、極めて高いサンプリング処理能力が得られ、実質的に無制限の数のフローについて分析が可能になる。

上述のように、本発明の主要な利点の1つはFISH分析に多くの蛍光フローを使用することにある。FISHに用





わが蛍光を発するか、その吸収したエネルギーを第2の蛍光体(フセオセライト)に伝達して後者を蛍光発光させることができるように、注意深く選択される。したがって、発光スベクトルの違いからフセオセライトとを識別することが可能である。

55

ドナーとアクセプタとの物理的分隔は、エネルギー転送効率は2つの蛍光体間の距離に依存する（典型的には効率は2つの蛍光体の距離に反比例する）。これらの2つの蛍光体を2つの異なる型の分子にもしくは2つの異なる状態にある同一の分子に付着させ、（順効的に取り付けられた）蛍光生物発光素を用いてFRETを測定する、と異なる分子（もしくは分子状態）、を、それらの空間的分布を同時に測定しながら、同時に能力が容易なものとなる。エネルギー転送現象に關する詳細な考察は分野の文献に見出すことができる [Herman (1989), Fluorescence Microscopy of Living Cells In Culture, Plenum Press, 第8巻, 219-243ページ, Taylor and Mangrove, Academic Press社; およびJovin and Andrit-Jovin (1989), Cell Structure and Function by Microspectrofluorimetry, 第5巻, Academic Press社参照]。

FRETは3つのパラメータを測定することによって行われる。これらは (i) ドナー吸収ピークで励起された時のドナー発光ピーク強度、 (ii) ドナー吸収ピークで励起された時のアクセプタ発光ピーク強度、および (iii) アクセプタ吸収ピークで励起された時のアクセプタ発光ピーク強度である。言い、これら3つのパラメータを校正および分析して、検査中の2つの蛍光体の分離および位置を得る。

て、この一般的な経験的測定方法の測定および解釈能力は、部分的に改善される。ここで提案される基本的な手法は、分光像を測定し、言い、この大量な情報を分光的および形態学的方法およびフルオロシムス共に使用して、細胞および細胞の細節を測定かつマッピングしようとするものである。

生物材料の組織学的検査を促進するために、前世紀中に、細胞の異なる巨大分子に特異的に結合する有機染色を用いる様々な染色技術が開発されたが、分子ペーシングの染色技術は今日まで経験的なものである。他の画像コントラスト強調法には使用野および偏光法のようなフルオロシムリング技術の使用が含まれる [Kam (1987), Quarterly Reviews of Biophysics, 20, 201-259ページ参照]。最も一般的な染色技術はロソフスキー-ギームザザ染色およびペトキンソン-エボンズである。ロソフスキー-ギームザザ染色法は2つの染料を用いるもので、その1つはアズールB（トリメチルメチン）、すなわちチジン染料であり、2つめはエボンズ（ヒドロキシベンゼンチンプロロイド）である。チジンにはカチオン性染料であり、したがって陰性細胞成分に結合する傾向があり、エボンズはアニオン性染料であり、塩基性細胞成分に結合する傾向にある。これら2つの要素はいわゆるロソフスキー-ギームザザ果を形成すると広く

分光生物量法係、特にスベントラキエノア系を用いる  
ことにより、測定結果が向上するのみならず、測定が容  
易になる。実際、分光生物量法は用いることにより、  
面庭がドナー受取者ある場合にはドナーおよびアクセ  
プター受取者の双方が同時に測定可能であるため、2回の  
測定しか必要とされない。

認められており、この効果は、いくつもの染色部位で特  
定の染色化合物の染料複合体の増進として表現されて  
いる。ある者はエオシン複合体の分子レベルは不明であ  
る。ある者はエオシンBがDNAの隣接基のようなア  
ニオン性構造に結合し、エオシンは同時にDNAの隣接する  
カチオン性部位およびエオシンBの双方に結合すると考

分光生物物理像法を用いることにより、FRET法をさらに発展させることができる。例えば、FRETを用いて、環境変化に感受性を有するアブセプタを指示し、分子距離測定と同時に、比濁像法を用いてミクロ環境変化をモニタリングすることができる。さらに別の例として、FRETを2つの異なるアブセプタと共に用い、(異なる発光スペクトルで)2つの分離距離および蛍光位置に関する情報を同時に供給することができる。二重アブセプタ実験を従来の方法で行うのは極めて困難である。分光生物物理像法の用はFRET結果の精度を高め、実験条件を簡略化し、より強力な分析法を可能にすることができる。

水學研究

IEEE Journal of Quantum Electronics QE-20, 1502-1506 (1984).  
 50. J. H. J. Hermans (1989), "Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture," *バイオ* 第3巻, 219-233.

トを改善するために数多くの方法が開発されており、それらには染色および空間アンサンブリングが含まれる。本発明の分光生物顕微鏡法の使用は、透過顕微鏡下で検査させられる細胞および組織の見掛け上のコントラストを増大させるための最も直接的な方法の一つであり、これによって、この一般的な顕微鏡的方法の固定および識別能力は、積極的に改善される。ここで観察される基本的な手法は、分光画像を測定し、次いで、この大量の情報を分光および分光形態学的分析法およびアルゴリズムと共に使用して、細胞および細胞下の細部を固定かつマッピングしようとするのである。

生物学的試料の組織学的検査を促進するために、前世  
紀中に、細胞中の異なる巨大分子を物理的に結合する有  
機染料を用いる様々な染色技術が開発されたが、分子一  
位の染色技術は今日まで経典的なものである。他の画  
像コントラスト強化法には増幅野および偏光法のような  
空間リアルタイム技術の使用が含まれる [Kam (198  
7), Quarterly Reviews of Biophysics, 20, 201–259p-  
ージ参照]。最も一般的な染色技術はローソウスキー  
ーザル染色およびベータキニンジン染色である。ロー  
ソウスキーーザル染色は2つの染料を用いるもの  
で、その1つはアズールB (トリスルメチオニン)、  
すなわちチアジン染料であり、2つめはエオジンY (ヒ  
ドロキシキサンテンゾロロイド) である。チアジンはカ  
チオン性染料であり、したがって陽性細胞成分に結合す  
る傾向にあり、エオジンはアニオン性染料であり、塩基  
性タンパク質に結合する傾向にある。これら2つの要素は  
いわゆるローソウスキーーザル染料を形成すると広く  
認められており、この効果は、いくつかの染色部位で特  
定の染色の新規な染料複合体の発達として現れる。  
アズールB-エオジン複合体の分岐性は不明であ  
る。ある著者はアズールBがDNAの磷酸基のようなニ  
オオン性部位に結合し、エオジンは両方にDNAの磷酸  
カチオン性部位およびアズールBの両方に結合すると考  
えている。より最近に提議されたアズールB-エオジン  
複合体のモデルでは、フリップトおよび同像 [Frie  
dlich et al (1990), Histochemistry, 93, 247–256p-

ヘンリー、Taylor and Mang編纂、Academic Press社、およびJovin and Kratoch-Jovin (1989)、Cell Structure and Function by Microspectrofluorometry、第5章、Academic Press社参照）。

どの技術でも、染色によって、細胞の細胞下区画を識別し、特に核内のクロマチン構造を識別することが可能である。ダーカウアルムに染色されたペテロクロマチンビュンに染色された真正クロマチンとの間の比は細胞中の片の細胞を評価する際的主要決定因子の1つであることが確立されている。しかしながら、染色された材料から得られた結果は依然として、ある程度は、経験、技術、および主観的解釈の問題である。科学者の経験による効果を低減するため、有機染料と巨大分子との間の相互作用の分光特性を研究し、したがって、DNA染色の仕組みをクロマチンキーマンが結果を評価しようとする必要が行われた。

透過光学顕微鏡法に適用された分光画像は細胞および組織の寸法、形状およびテクスチャ特性の定量的測定を大規模に向上させることができる。この技術は形質計測と呼ばれ、生物学および病理学において急成長している分野である [Ehtai et al (1993), Modern Pathology 6, 612 ~618ページ]。形質計測分光画像分析は微細な組織学的および生化学的特性を評価し、診断的および予知的評価のための有用な超構造的および医学的情報を得ることを可能にする [Hyattigton et al (1992), Cancer 69, 88 ~212ページ]。本発明の方法による分光生体像を用い、染色された組織における真正クロマチンに対するヘテロクロマチンの比を定量的に測定しかつ異なる組織小断片を測定する能力は下記および実施例2で示される。

この技術は染色された細胞中の核組織を識別する制限の能力を高める。このような画像は特定の組織に関連する定量的な結果として生成することができる。

図10a~dは図9aのサンプルを用いて再構築した4つの定量的類似性マッピング画像を示すものである。図10aは図9aのサンプルを参照サンプルとする真正クロマチンと再構築された類似性マッピングの真真正クロマチン例の微細構造が顕著に強調されている。真正クロマチンネットワークが核の全部にわたって緊密に結合し、核膜の上部にまで及んでいることが検出される。核の中心には特に明るい部位があり、核全体を示すものと認められる。図10bは図9aの参照サンプルマッピングによって支持される。図10cは図9aの参照サンプルマッピングによって支持される。図10dは図9aの参照サンプルマッピングによって支持される。

細胞生物学における分光光生物像の利点は、この技術  
が所定の染色された細胞の分光光情報を点ごとに測定で  
きることにあり、細胞画像のあてどセルは所定の点にお  
ける透過光に関する正確な情報を提供し、これは直ちに  
吸収スペクトルに換算される。図9aは血液用のメーグ  
ル・ワルドー・ギーマン法によって染色された血液血球を  
示すものである。図9bは細胞の様々な細胞下部位、およ  
び矢印で示された4つのスペクトルが収集されたピケセ  
ルを示す。ピケセルはアネログロラッチ、ピケセルB  
は青色染色された細胞質ノック領域、ピケセルCは細胞質  
小胞、ピケセルEは細胞質ノック中の点を示す。これらの  
スペクトル(A〜E)はこの分光像中に存在する1万個  
のうちの5つに過ぎない。図9aは細胞画像のこれら5つ  
のピケセル由来の透過光スペクトルを示す。これらのス  
ペクトルは入射照明光線について校正がされている。  
真正ピコラッチおよびピコラッチからの透過光は  
強度が低く、いくらかの分光ピコラッチ(図9aにおけるス  
ペクトルAおよびCを比較された)ことが認められ  
る。

吸収を示す。染色された細胞中の細胞核区域 (A~E) は画像中に肉眼で認められる色価面 (色調) となる分光特性を有することから認められる。しかしながら、肉眼に異なる着色巨大分子複合体をこれらの色に基づいて識別するためには能力が限られている。スベクトラキエマーをベースとするシステムを本発明と組み合わせると、画像から選択されたスベクトルを、全画像を構成する他の 1 万個の異なるスベクトルと比較することが可能になる。したがって、画像の各点は選択された (すなわち移動) スベクトルに対する、あるレベルの類似性によって特徴づけられる。上述の類似性マッピングと呼ばれる処理アルゴリズムは元の分光像からグレースケール画像を形成する。原則として、このアルゴリズム (および他の多くの類似したアルゴリズムが複製可能である) を用いることにより、選択された参照ビクセル (類似した特性を有する画像中のすべてのビクセルを見出す) ことができない。この技術は染色された細胞中の複製細胞を識別する問題の能力を高める。このような画像は特定の画像に関連通ずる定量的な結果として定義することができ、

20 図10a-eは図9aのスベクトルを用いて再構築した4つの定量的類似性マッピング画像を示すものである。図10aは図9aの類似性マッピングを参照スベクトルとするマッピングで再構築された類似性マッピングである。核内の真正クロマチン領域の微細構造が顕著に強調されている。真

25 正クロマチンネットワークが核の全部にわたって緊密に結合し、核膜の上部にまで及んでいることが検出できる。核の中心には特に明るい部位があり、核本体を示すものと思われるが、この推測は図10cに示す類似性マッピングによって支持される。図10bは図9aの参照スベクトルBを用いて構成された類似性マッピングを示すものである。この図では2つの主要な特性が認められ、これらは双方とも境界外縁に関連する。その1つは細胞の中心にあり、他方は細胞外縁を画定するものである。新形成に

30 された画像は、細胞質マシンの中心の明るいブローは大きなゴルジ複合体であるという考えを支持することができ、この解釈は、ゴルジ領域を取り巻く周囲の液相を示す図10dの類似性マッピングによって支持される。図9aの参照スベクトルCを用いたマッピングは、マシンの位置を示す図10eに示す。この画像は図10aに示したものと補完的であるが、他方、核クロマチン領域の様々な複合体間におけるいくつもの予期できない結合を示している。最後に、図10fは、図9aのスベクトルDおよびEを組み合わせたマッピングによって得られたものであり、細胞マシンの液相構造、主として細胞質液相を明らかにしている。驚くべきことに、この類似性マッピングは、細胞下区画を取り巻く別の層である核膜を識別す

る。

これらメイグルンソルドーギーマザ染色された細胞の分光画像結果に基づけば、各点（もしくはピクセルとの分）として定義されるものは、数種のカテゴリに分類できる

その特異的な吸収および透過スペクトルを有している。研究の進捗点では、「葉色相ノヴァキキーユーサツ発色体」と呼ばれるものと、高い相関を有することのできる分光組成を示すいくつかの兆候が存在する。ペチコロロチンの吸収スペクトル (図10c) は明らかに540nmにおいて顕著なピークを示しており、これは「葉色相ノヴァキキーユーサツ発色体」と記載されたものと良好に対応している [Friedrich et al (1990), *Lasers in Surgery and Medicine: Profile* (1984), *IEEE Journal of Quantum Electronics* QE-20, 1502~1506; ペー・J・Herman (1989), *Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture*, バート・B, 第8巻, 219~243; ペー・J, Taylor and Francis, Academic Press; およびUjovin and Arndt-Jovin (1989), *Cell Structure and Function by Microspectrofluorimetry*, 第5巻, Academic Press; 参照]。分光的な細胞質特性 (図9aのスペクトルB) は類似したスペクトルに用いられると、数値、グラフ、細胞質組成、および細胞外膜を示すときならぬ、染色された細胞に適用することも可能に、しかしながら、染色された細胞は、空気中で乾燥されると、細胞質膜の重なりを招き、これによって見掛け上の吸収変化が生ずることがある。細胞の特定の深さに集中し、したがって、この技術の可能性がある顕著に向上することのできるアルビド下固まのの使用が、分光組成をさらに発展させるために、促進される。

ある場合には、透過法および未染色組織を用いて得た分光吸収が、蛍光顕微鏡法によって見出されるものと類似した情報を提供することがある。分光蛍光生物顕微鏡と透過顕微鏡法とを組み合わせることの利点の1つは、「ブラーン法」測定技術が使用可能であること、すなわち、構造的に重要な染料もしくは固定剤を使用する必要がないことにある。

したがって、本発明によれば、高い空間および分光分解能を併せ持つ分光生物顕微鏡法が提供され、この方法は、(a) 分光顕微鏡とされるべきサンプルを照射する工程、(b) そのサンプルを分光装置を通して観察する工程、この分光装置は撮像光学系と光電管とを有しており、分光装置および撮像分光系は、(1) コリメータ光学要素を用いてサンプルの全ビクセルから入射光を同時に収集し、(2) コリメータとされた入射光を多数の要素を有する干渉計系に通し、まず、光が干渉計内部で異なる方向に進行する2つのコヒーレント光線に分割され、次に2つのコヒーレント光線が再結合されて互いに干渉して出力光線が形成されるようにし、(3) 出力光線は、検出器要素の2次元アレイを有する検出器上に出力光線を収集する受光光学系に通し、各時点で検出器要素の各々がサンプルの1つの、全測定要素を通じて常に同一のビクセルであり、サンプルの実体は検出器アレイ上で固定され、測定中のあらゆる時点で像は可視かつ

機能可能であり、各出力要素は、異なる波長やビタセルから発生される光の強度の特定的一次値または二次値を生成するように、この一次結合は1つの要素光路並の要素とし、(iv)干渉計系、の少なくとも1つの要素を回転し、干渉計系によって生成された2つのコヒーレント光の線の間、光路差がサブワルの全ビタセルについて同時に決定できるように、(v)配鏡装置を用いた各出力要素の信号を時間の関数として記録し、データの第1の要素を形成することによってサブワルの各ビタセルのサブワルを得るためのものである。および(c)整型コンフォーマを用いて第1の要素を解算する工程を、この方法はさらに(c)解算されたデータの要素をサブワルをサブワルする工程を含んでもよい。光路差は上述のいずれのものであってもよい、これらに限定されるものではない、コリメータされた光はサブワルの透過光、反射光、散乱光、もしくはは導光光とすることができ、サブワルの導光光は殺与されたプロウの導光、殺与とされたプロウに誘導された導光、もしくはは自然光とすることができ、光はいかなる状態でも、例えば、レーザ、白色光、偏光光、紫外光および可視光、もしくはは小さな波長範囲を有する光等、いかなる型のものでもでき、光路は同時または順に作動させることもできる。光路は複数の光線は複数の光線に異なるもの

かである。二次元プレーはビチオ酸のCD、希到底タイナミツカレンジCD、増殖CDもしくは時間ゲート増殖CCDとすることができ、サンアルは、細胞、組織、もしくは全生体等、あらゆる生物学的サンプルとすることができ、ヒトを含むいかなる種に由来したものであってもよい、細胞はバット細胞と収集された細胞、血球、胎児細胞、悪性の癌がある細胞、分裂間期中の細胞、有糸分裂中の細胞もしくは減数分裂中の細胞を含むいずれの型の細胞であってもよい、組織は、眼の組織、網膜血管、肝臓、皮膚、角膜、毛髪、筋、胃、腸、膀胱、精液、直腸、頸部、動脈、静脈もしくはは眼を含むいずれの型であってもよい。

さらに、本発明によれば、サンアラは細胞、組織切片もしくは生体とすることができ、光はフローラによって誘導され、本方法はその細胞成分に結合するものと誘導され、本方法はその細胞成分の存在もしくはレベルを検出するためのものとなる。フローラは非発光光感受器を含むことができ、誘導されるのは蛍光発散の蛍光発光である、フローラはさらに、デオキシリボ核酸および/もしくはリボ核酸のような核酸分子を含むようにでき、この場合、本方法は細胞の核酸分子と相互作用の存在もしくはレベルを検出するために用いられる。また、フローラは抗体を含むことができ、この場合、本方法は、抗体によって認識される細胞タンパク質の存在もしくはレベルを検出するために用いられる。蛍光発散は生物学的用途に用いられるいかなる置換基でもよく、当業者は理解されるように、生物学的用途に用いられ、

れる未発見のいかなる蛍光現象をさらに含んでもよい。数理アルゴリズムAは上述のアルゴリズムAから選択するそのようにすることができ、また、上述のアルゴリズムAのいかなる組も、合っておりてもよく、また、当業者に理解されるようには、数理アルゴリズムAは分光像を分析および/もしくは表示するのに適した現在既知もしくは未開発のいかなるものであってもよい。

本発明の方法はサンツルムに投与された真鍮の蛍光体の分光特性のため、例えば、制限されるものではないが、サンツルムの例所電位差、すなわちより細胞外および細胞内（*intracellular*）環境のようなミクロ環境変化を提示するものである。例えば、水素、ナトリウム、マグネシウム、亜鉛およびカルシウム中の薬性炭素、ポリアリールエーテルもしくは細胞質タンパク質のような天然成分からの自然蛍光を測定するため、サンツルムの少なからぬ種の蛍光体と周囲の塩分分離を決定するための蛍光共鳴エネルギー転送法を測定し、例えば、制限されるものではないが、サンツルムを測定し、例えば、制限されるものではないが、サンツルム中の細胞の域内のクロマチン機構の型のような結晶状態および細直下細胞を同定かつマッピングするため、時間の経過としてサンツルム中の生命過程をモニタするため、インジケータの染色体ペプチドを含みインジケータペプチドマーカーコンプレックスにおける蛍光のため、および細胞分裂のために用いることができる。

ないで、上記の説明と共に本発明を示す以下の実施例を参照する。

**実験説明**  
細胞は生体エネルギーを消費したとき、濃を与えたシロアリシロの消化サイクルの分光画像分析  
この実験例は、細胞の生命サイクルの異なる時点で、細胞の特定の化学物質もしくは小腸管の濃を細胞内エネルギーを測定し、各試料において、細胞の特定の化学物質もしくは小腸管の濃を細胞内エネルギーで測定することにより、細胞の生命過程を明らかに示すものである。したがって、これは、時間の経過として、細胞の小腸管の濃の運動もしくは化学的変化、エネルギー交換、もしくは代謝反応を明らかにする、本実験および生命過程の研究に理想的であるのは、高い解像度および生体エネルギーで行うことにより、細胞および組織を伸縮させ、これらの化学変化を容易に追跡することができ、これらの変化は生命過程自体に関連しているからである。

4つの別個の細胞部位（すなわちドメイン）における葉緑体の2つのスベクトルを示すものである。蛍光顕微鏡（オキシバシ社のBME REC）に取り付けられたスベクトラキエーアンプシステムを使用して生体フリアンズを分析した。ソクラシ細胞は緑色光源（パシバシ燈大545nm）で励起し、赤色蛍光をこのシステムで測定した。スベクトル1および2は630nmおよび685nmにおける蛍光ピークがわかるに具なっていることが認められる。これら2つのピークの相対強度はスベクトル3〜6に示される。

るように細胞内の局在性の関数として変化する。

ソリウムシイ類はそれた藻の未加工の葉葉葉自然光像を図12に示す。ソリウムシ細胞質中にはわずかに緑色葉葉葉光強度の変化が認められない。上記の顕色アブビ分光分析システムを使用することにより、可能程度の分光分析による細胞構造を表示することができた。他のすべてのピクセルとの比較の基準となるソリウムシ細胞 (図11a) の周辺および中心から測定された5つのピクセルの蛍光スペクトル、およびその結果を5つの異なる顕色画像で示す。これら5つのスペクトルは顕色アブビ分光によって他のすべてのピクセルと比較し、これらの結果を図12b-eに示す。

図12bに示すように、図11aのスベトルム1を参照として用いる類似性ツェンブルにより、ソラリシ上部に於ける別個の(白い)優勢な葉が明かになった。これらのツェルムは高い垂直量の天然葉幕結果を明示し、これらスベトルムはおそらく細胞面およびロ腔前庭を示すものである。図12cに示すように、図11aのスベトルム2を参照して用いる類似性ツェンブルにより、細胞面頭および胞質ソルに隣接して、移動距離を示す各々約1ピクセルの小さなスベトルム3もしくは4を参照として用いる類似性ツェンブルにより、細胞質の中間部は、650nmの低いピークによって特徴づけられる、減成した葉かの

なる大きな模造品明らかとなった。図12.6の画像は図12.5のスペクトルを参照として用いる類似性マッピングによって得られたものである。図12.6の右側の区画には、ほぼ同一の6530/6556比を示す狭く測定された類似品が明らかにされている。したがって、図12.6は同一のフュエルシリンダーによる異なる種類の進行した段階である。図11.6dのスペクトルを参照として用いる類似性マッピングによって得られた図12.7の画像は、外排気管近所にある大きな模造品を提示しており、これはおそらく消化された生質物細胞から降着する細胞残渣を示すものである。この外質物となる生質物は天然炭素の含有量が最低であり、フュエルシリンダー含有量が最大である。

図 3.13 に示される 2 つのソクリアシの湖底辺線に生ずる藻類生態系の赤色蛍光スベークを明示する。スベークは、それと結合するソクリアシの部分および部分の底線に由来する。これら 2 つのスベークは、高 1,630 nm ビークおよび低 1,655 nm ビークを示す。大した 95 nm ビークを有する同一のスベークが、湖底辺線および湖底線から得られるセルにおいて、細胞の中いかなる部位にも蛍光を発生させるとして、記録された。図 4.14 中の図 3.0 のスベークは、これを参照して用いて、交配するソクリアシ中の湖底辺線および天然藻類結合の類似性ソベークの関係を明らかにする。ソクリアシの有性交配は、一般に細胞の付着によって始まる。図 4.14 中の 3 つの交配細胞の付着によって始まる。図 4.14 中の

示す2つの細胞は、図130のズベクトル2を参照として用いてワンプザされた、一方が他方よりも大きな濃度勾配細胞を含有するもので、それら2点A1およびA2のI細胞に对应する [Morris et al (1994), Appl Spectroscopy 48, 867-866]。図130の低濃度スベクトル3を類似性ワンプザの参照として使用すると、図146に示すように、2つの交配細胞の細胞質を見ることができ、葉緑素分解の欠如はこれらの細胞中の葉の共生状態を明示する。

よって、実施例1は、適当なアルゴリズムと組み合わせられたフーリエ変換多ビクセル分光法によって単一生物細胞からの分光情報が明らかにできることを示す。

空間情報は蛍光強度およびスベクトルの点毎の情報と双方を明らかにし、これらの情報によれば、類似性ワンプザアルゴリズムを用いて局所的な化学情報を明らかにすることができ、従来のミクロ蛍光強度法を用いたり、狭いペンビュングを用いた場合には、ペンセル毎の情報は容易に得られなかった、交換可能なアルゴリズムに基づいた比濃度は、容易に得られない主要な分光情報と必要とするため、本発明の制限を有している、もう1つの制限は、少数の適当なアルゴリズムを調節する必要性である。このように、アルゴリズムをベースとした濃度はワンプザの波長および空間依存性の強度を容易に得ることのできるものではない、一方、分光像使用の回転アルゴリズム装置は生物学的な方法には適当でない [Morris et al (1994), Appl Spectroscopy 48, 867-866]。アルゴリズム分光法と組み合わせた共焦点走査レーザー顕微鏡法 [Trop et al (1994), J. Microscopy 176, 238-244] はビクセル分光情報を明らかにする能力を有しているが、多ビクセル分光情報に基づく類似性ワンプザおよび画像再構築のためにには現在まで開発されていない。

この実施例では、単一の生物細胞において区分化された葉緑素合成過程を可視化するためにフーリエ変換多ビクセル分光法を使用した、ソリウムシの食物サイクルの生化学は2つの主過程からなり、その1つはあらゆるエンボサイトームシ性細胞の一般規則として、葉緑素を細胞内のプロトペンビュングによって限定的にすることである。次の工程では、エンボサイトームシ性細胞とのリソニア融合によって、加水分解性葉緑素がエンボサイトームシ性細胞を加水分解するエンボサイトームシ性細胞を形成する。低塩と加水分解性リソニア活性によって、図15 (分子AおよびB) に示すように、天然葉緑素はフエオアアインに滅菌する。葉緑素からのワググシムスの損失は60nmから65nmの分光蛍光シフトの指標である。さらなるリソニア葉緑素の加水分解活性により、テトラピロメタンを置き、蛍光性のない微細構造を形成する (図150の分子C)。これら3つの状態は上記に示されており、このような変化が生じた細胞部位の位置を明らかにした。分光情報を使用すれば、天然葉緑素およびフエオアアインの部位および、滅菌サイクルの終端を示す

低濃度部位の位置を明らかにすることができた。

葉緑素もしくはフエオアアインの同定可能ないずれかのスベクトルの分光ワンプザおよび画像再構築によって得られた画像は生化学過程の空間情報および決定された場所を含んでいる。したがって、本発明の方法を使用する分光像分析は、静態反応中に分光変化が起る生物細胞中における代謝過程を明らかにするために理想的である。

#### 実施例2

10 骨髄正赤芽球および巨核芽球におけるクロマチン融合：多ビクセル分光分析および類似性ワンプザによる濃度血液の濃度的な分析は、アズールBおよびエオジン染料を用いるマイグレーションルビーアズールBはワググシムスの蛍光のいすれかによる色に基づく。分光ミクロ分析は従来の方法で染色された細胞から得られるデータを強調することが認められた。すなわち、分光サトララシヨンプザを用いて、カルベス等 [Gadraitis et al] は様々な細胞構造の濃度色が染料成分の割合変化によって説明できることを示した [Gadraitis et al (1980), J. Microsc., 119 (3): 313-320]。フーリエトランス (Freidrich et al) はワググシムス染料染色された細胞は、いわゆるワググシムス染料と染料複合体の染色面に来る、鋭く強い吸収帯を55nmに有していることを示した。他の吸収帯はDNAに結合したアズールBのカチオンに由来する [Freidrich et al (1990), Histochemistry 93 (3): 247-56]。エオジンのアミノ基は主に疎水性相互作用によって電気的中性のDNA-アズールB複合体のアズールB骨格に結合する。エオジン吸収帯はエオジンと電気的中性のDNA-アズールB複合体のアズールB骨格との相互作用によって赤色シフトする [Freidrich et al (1990), Histochemistry 93 (3): 247-56]。核クロマチン密度のコンピュータ化された分光ミクロ分析を用いることにより、スピナ等 [Spina et al] は異性および悪性乳房細胞の間の顕著な区別を明らかにした [Spina et al (1992), Visions-Arch-B-Coll-Pathol 60 (2): 119-24]。この方法の原理は、マイグレーションルビーアズールB染色された細胞の濃度の追加のバググシムスとして、真正クロマチンからヘテロクロマチンへの高いコントラストと均配的な濃度の分析に基づいたものである。この方法においては、コンピュータに提供された2つの画像ローバンスアルゴリズムの間のサトララシヨンプザを用いられ、したがって、デジタル化された画像上には高コントラストと均配の値しか保持されなかった。

45 赤血球前駆体の成熟中、核および膜の双方は一種の定性的形態変化を示す。赤血球系列のうち、最も初期に認識可能な要素である前赤芽球は、一般に原始細胞を特徴づける。細胞質濃度、核、核膜の濃度もしくは点状核クロマチンおよび大きな細胞核を示している。前赤芽球は一種の有核細胞を生じ、赤芽球は融合が拡大す

る核クロマチンを新形成させて、仁および細胞質濃度基性を示し、増加するヘモグロビン含量を得る。このシグナスは注意の段階に分類されるが、それらは通常3段階、すなわち (I) 好塩基性もしくは初期赤芽球、あるいは正赤芽球A、(II) 多染色性もしくは中期赤芽球あるいは正赤芽球B、(III) 正染色性もしくは後期赤芽球、あるいは正赤芽球C [Hayhoe and Plemons (1992) Hematological Cytology, 第3版, 11ページ, Wolfe Publishing, London]。正染色性正赤芽球は小型で核濃度性であり、その細胞質はわずかに多染色性である。正赤芽球もしくは正赤芽球のいずれかの核濃度基性は、ベタミシB2もしくは葉緑素、骨格形成、化学療法効果等、様々な状況で観察される。

この実施例の目的は本発明の方法と組み合わせられたスベクトルキエーアインシステムと赤血球新生赤芽球の核から多ビクセル分光情報を得、かつクロマチン融合と分光データとを相関させることができることを示すことにある。すなわち、核クロマチン構造と細胞化との間の相関は、核の幾何学および空間的配置に左右されず、分光的濃度によって可能になるであろう。

マイグレーションルビーアズールB染色された赤芽球の多ビクセル分光分析した。典型的には単一の細胞から、各々細胞の異なる細胞部位 (すなわちペンセル) を示す10個のペンセルを得た。各ビクセルについて2組の相関データ、すなわち透過および吸収スベクトルを得。図16aおよび16bはそれぞれ単一の細胞の5つの異なる細胞部位 (すなわちペンセル) の透過および吸収スベクトルを示すものである。スベクトルAはペンセルクロマチン、スベクトルBは真正クロマチン、スベクトルCは細胞質濃度 (すなわち青色細胞質)、スベクトルDは細胞質濃度 (すなわち青色細胞質)、スベクトルEはゴルジ装置のものである。異なる赤血球分化細胞に由来する細胞核の透過スベクトル (例えば図16aのスベクトルA) は類似したパターンを示す。すなわち、図16bのスベクトルAに示すように450-700nmの領域に低い光透過率を有すると共に、吸収帯を550および570nmに備えている。550nmの強い吸収帯はいわゆるワググシムス-DM複合体に起因することができ、このように、細胞下レベルで特異的な分光的特徴が得られた。赤血球細胞中の真正クロマチン (例えば図16aおよび16bのスベクトルB) は550-720nmの分光強度で高い吸収率を示し、図16aおよび16bの分光の外観は核部位に異なっていた。細胞染色結合異性は異なるパターンを示した。すなわち、一般に高い光透過能力および青色シフトを有するスベクトルC (例えば図16aおよび16bのスベクトルCおよびVD) を示した。ゴルジ装置 (図16aおよび16bのスベクトルE) および他の細胞質アインは高濃化された分光パターンを明らかにした。

10 ローチンおよび細胞質成分のスベクトル (それぞれ図16aのスベクトルA,B,C) を赤血球新生の4段階 (すなわち赤血球の分化) を代表する4つの細胞の元胞の核の10個の細胞との類似性ワンプザ分析のための参照スベクトルとして使用した。上述のように、類似性ワンプザ関数は1つの選択されたスベクトルの面積積分と分光キエーアの他のスベクトルとの間の差を計算する。再構築された画像はグレースケールに対応して明るさの変化したビクセルからなり、2つの間の類似性の程度を明示する。すなわち、この実施例では、ビクセルが明るいほど、2つのスベクトルはより類似している。図17a, 17b, 17c, 17d, 17e, 17f, 17g, 17h, 17i, 17j, 17k, 17l, 17m, 17n, 17o, 17p, 17q, 17r, 17s, 17t, 17u, 17v, 17w, 17x, 17y, 17z, 17aa, 17ab, 17ac, 17ad, 17ae, 17af, 17ag, 17ah, 17ai, 17aj, 17ak, 17al, 17am, 17an, 17ao, 17ap, 17aq, 17ar, 17as, 17at, 17au, 17av, 17aw, 17ax, 17ay, 17az, 17ba, 17bb, 17bc, 17bd, 17be, 17bf, 17bg, 17bh, 17bi, 17bj, 17bk, 17bl, 17bm, 17bn, 17bo, 17bp, 17bq, 17br, 17bs, 17bt, 17bu, 17bv, 17bw, 17bx, 17by, 17bz, 17ca, 17cb, 17cc, 17cd, 17ce, 17cf, 17cg, 17ch, 17ci, 17cj, 17ck, 17cl, 17cm, 17cn, 17co, 17cp, 17cq, 17cr, 17cs, 17ct, 17cu, 17cv, 17cw, 17cx, 17cy, 17cz, 17da, 17db, 17dc, 17dd, 17de, 17df, 17dg, 17dh, 17di, 17dj, 17dk, 17dl, 17dm, 17dn, 17do, 17dp, 17dq, 17dr, 17ds, 17dt, 17du, 17dv, 17dw, 17dx, 17dy, 17dz, 17ea, 17eb, 17ec, 17ed, 17ee, 17ef, 17eg, 17eh, 17ei, 17ej, 17ek, 17el, 17em, 17en, 17eo, 17ep, 17eq, 17er, 17es, 17et, 17eu, 17ev, 17ew, 17ex, 17ey, 17ez, 17fa, 17fb, 17fc, 17fd, 17fe, 17ff, 17fg, 17fh, 17fi, 17fj, 17fk, 17fl, 17fm, 17fn, 17fo, 17fp, 17fq, 17fr, 17fs, 17ft, 17fu, 17fv, 17fw, 17fx, 17fy, 17fz, 17ga, 17gb, 17gc, 17gd, 17ge, 17gf, 17gg, 17gh, 17gi, 17gj, 17gk, 17gl, 17gm, 17gn, 17go, 17gp, 17gq, 17gr, 17gs, 17gt, 17gu, 17gv, 17gw, 17gx, 17gy, 17gz, 17ha, 17hb, 17hc, 17hd, 17he, 17hf, 17hg, 17hh, 17hi, 17hj, 17hk, 17hl, 17hm, 17hn, 17ho, 17hp, 17hq, 17hr, 17hs, 17ht, 17hu, 17hv, 17hw, 17hx, 17hy, 17hz, 17ia, 17ib, 17ic, 17id, 17ie, 17if, 17ig, 17ih, 17ii, 17ij, 17ik, 17il, 17im, 17in, 17io, 17ip, 17iq, 17ir, 17is, 17it, 17iu, 17iv, 17iw, 17ix, 17iy, 17iz, 17ja, 17jb, 17jc, 17jd, 17je, 17jf, 17jg, 17jh, 17ji, 17jj, 17jk, 17jl, 17jm, 17jn, 17jo, 17jp, 17jq, 17jr, 17js, 17jt, 17ju, 17jv, 17jw, 17jx, 17jy, 17jz, 17ka, 17kb, 17kc, 17kd, 17ke, 17kf, 17kg, 17kh, 17ki, 17kj, 17kl, 17km, 17kn, 17ko, 17kp, 17kq, 17kr, 17ks, 17kt, 17ku, 17kv, 17kw, 17kx, 17ky, 17kz, 17la, 17lb, 17lc, 17ld, 17le, 17lf, 17lg, 17lh, 17li, 17lj, 17lk, 17ll, 17lm, 17ln, 17lo, 17lp, 17lq, 17lr, 17ls, 17lt, 17lu, 17lv, 17lw, 17lx, 17ly, 17lz, 17ma, 17mb, 17mc, 17md, 17me, 17mf, 17mg, 17mh, 17mi, 17mj, 17mk, 17ml, 17mn, 17mo, 17mp, 17mq, 17mr, 17ms, 17mt, 17mu, 17mv, 17mw, 17mx, 17my, 17mz, 17na, 17nb, 17nc, 17nd, 17ne, 17nf, 17ng, 17nh, 17ni, 17nj, 17nk, 17nl, 17nm, 17no, 17np, 17nq, 17nr, 17ns, 17nt, 17nu, 17nv, 17nw, 17nx, 17ny, 17nz, 17oa, 17ob, 17oc, 17od, 17oe, 17of, 17og, 17oh, 17oi, 17oj, 17ok, 17ol, 17om, 17on, 17oo, 17op, 17oq, 17or, 17os, 17ot, 17ou, 17ov, 17ow, 17ox, 17oy, 17oz, 17pa, 17pb, 17pc, 17pd, 17pe, 17pf, 17pg, 17ph, 17pi, 17pj, 17pk, 17pl, 17pm, 17pn, 17po, 17pp, 17pq, 17pr, 17ps, 17pt, 17pu, 17pv, 17pw, 17px, 17py, 17pz, 17qa, 17qb, 17qc, 17qd, 17qe, 17qf, 17qg, 17qh, 17qi, 17qj, 17qk, 17ql, 17qm, 17qn, 17qo, 17qp, 17qq, 17qr, 17qs, 17qt, 17qu, 17qv, 17qw, 17qx, 17qy, 17qz, 17ra, 17rb, 17rc, 17rd, 17re, 17rf, 17rg, 17rh, 17ri, 17rj, 17rk, 17rl, 17rm, 17rn, 17ro, 17rp, 17rq, 17rr, 17rs, 17rt, 17ru, 17rv, 17rw, 17rx, 17ry, 17rz, 17sa, 17sb, 17sc, 17sd, 17se, 17sf, 17sg, 17sh, 17si, 17sj, 17sk, 17sl, 17sm, 17sn, 17so, 17sp, 17sq, 17sr, 17ss, 17st, 17su, 17sv, 17sw, 17sx, 17sy, 17sz, 17ta, 17tb, 17tc, 17td, 17te, 17tf, 17tg, 17th, 17ti, 17tj, 17tk, 17tl, 17tm, 17tn, 17to, 17tp, 17tq, 17tr, 17ts, 17tt, 17tu, 17tv, 17tw, 17tx, 17ty, 17tz, 17ua, 17ub, 17uc, 17ud, 17ue, 17uf, 17ug, 17uh, 17ui, 17uj, 17uk, 17ul, 17um, 17un, 17uo, 17up, 17uq, 17ur, 17us, 17ut, 17uu, 17uv, 17uw, 17ux, 17uy, 17uz, 17va, 17vb, 17vc, 17vd, 17ve, 17vf, 17vg, 17vh, 17vi, 17vj, 17vk, 17vl, 17vm, 17vn, 17vo, 17vp, 17vq, 17vr, 17vs, 17vt, 17vu, 17vv, 17vw, 17vx, 17vy, 17vz, 17wa, 17wb, 17wc, 17wd, 17we, 17wf, 17wg, 17wh, 17wi, 17wj, 17wk, 17wl, 17wm, 17wn, 17wo, 17wp, 17wq, 17wr, 17ws, 17wt, 17wu, 17wv, 17ww, 17wx, 17wy, 17wz, 17xa, 17xb, 17xc, 17xd, 17xe, 17xf, 17xg, 17xh, 17xi, 17xj, 17xk, 17xl, 17xm, 17xn, 17xo, 17xp, 17xq, 17xr, 17xs, 17xt, 17xu, 17xv, 17xw, 17xx, 17xy, 17xz, 17ya, 17yb, 17yc, 17yd, 17ye, 17yf, 17yg, 17yh, 17yi, 17yj, 17yk, 17yl, 17ym, 17yn, 17yo, 17yp, 17yq, 17yr, 17ys, 17yt, 17yu, 17yv, 17yw, 17yx, 17yy, 17yz, 17za, 17zb, 17zc, 17zd, 17ze, 17zf, 17zg, 17zh, 17zi, 17zj, 17zk, 17zl, 17zm, 17zn, 17zo, 17zp, 17zq, 17zr, 17zs, 17zt, 17zu, 17zv, 17zw, 17zx, 17zy, 17zz, 17aa, 17ab, 17ac, 17ad, 17ae, 17af, 17ag, 17ah, 17ai, 17aj, 17ak, 17al, 17am, 17an, 17ao, 17ap, 17aq, 17ar, 17as, 17at, 17au, 17av, 17aw, 17ax, 17ay, 17az, 17ba, 17bb, 17bc, 17bd, 17be, 17bf, 17bg, 17bh, 17bi, 17bj, 17bk, 17bl, 17bm, 17bn, 17bo, 17bp, 17bq, 17br, 17bs, 17bt, 17bu, 17bv, 17bw, 17bx, 17by, 17bz, 17ca, 17cb, 17cc, 17cd, 17ce, 17cf, 17cg, 17ch, 17ci, 17cj, 17ck, 17cl, 17cm, 17cn, 17co, 17cp, 17cq, 17cr, 17cs, 17ct, 17cu, 17cv, 17cw, 17cx, 17cy, 17cz, 17da, 17db, 17dc, 17dd, 17de, 17df, 17dg, 17dh, 17di, 17dj, 17dk, 17dl, 17dm, 17dn, 17do, 17dp, 17dq, 17dr, 17ds, 17dt, 17du, 17dv, 17dw, 17dx, 17dy, 17dz, 17ea, 17eb, 17ec, 17ed, 17ee, 17ef, 17eg, 17eh, 17ei, 17ej, 17ek, 17el, 17em, 17en, 17eo, 17ep, 17eq, 17er, 17es, 17et, 17eu, 17ev, 17ew, 17ex, 17ey, 17ez, 17fa, 17fb, 17fc, 17fd, 17fe, 17ff, 17fg, 17fh, 17fi, 17fj, 17fk, 17fl, 17fm, 17fn, 17fo, 17fp, 17fq, 17fr, 17fs, 17ft, 17fu, 17fv, 17fw, 17fx, 17fy, 17fz, 17ga, 17gb, 17gc, 17gd, 17ge, 17gf, 17gg, 17gh, 17gi, 17gj, 17gk, 17gl, 17gm, 17gn, 17go, 17gp, 17gq, 17gr, 17gs, 17gt, 17gu, 17gv, 17gw, 17gx, 17gy, 17gz, 17ha, 17hb, 17hc, 17hd, 17he, 17hf, 17hg, 17hi, 17hj, 17hk, 17hl, 17hm, 17hn, 17ho, 17hp, 17hq, 17hr, 17hs, 17ht, 17hu, 17hv, 17hw, 17hx, 17hy, 17hz, 17ia, 17ib, 17ic, 17id, 17ie, 17if, 17ig, 17ih, 17ii, 17ij, 17ik, 17il, 17im, 17in, 17io, 17ip, 17iq, 17ir, 17is, 17it, 17iu, 17iv, 17iw, 17ix, 17iy, 17iz, 17ja, 17jb, 17jc, 17jd, 17je, 17jf, 17jg, 17jh, 17ji, 17jj, 17jk, 17jl, 17jm, 17jn, 17jo, 17jp, 17jq, 17jr, 17js, 17jt, 17ju, 17jv, 17jw, 17jx, 17jy, 17jz, 17ka, 17kb, 17kc, 17kd, 17ke, 17kf, 17kg, 17kh, 17ki, 17kj, 17kl, 17km, 17kn, 17ko, 17kp, 17kq, 17kr, 17ks, 17kt, 17ku, 17kv, 17kw, 17kx, 17ky, 17kz, 17la, 17lb, 17lc, 17ld, 17le, 17lf, 17lg, 17lh, 17li, 17lj, 17lk, 17ll, 17lm, 17ln, 17lo, 17lp, 17lq, 17lr, 17ls, 17lt, 17lu, 17lv, 17lw, 17lx, 17ly, 17lz, 17ma, 17mb, 17mc, 17md, 17me, 17mf, 17mg, 17mh, 17mi, 17mj, 17mk, 17ml, 17mn, 17mo, 17mp, 17mq, 17mr, 17ms, 17mt, 17mu, 17mv, 17mw, 17mx, 17my, 17mz, 17na, 17nb, 17nc, 17nd, 17ne, 17nf, 17ng, 17nh, 17ni, 17nj, 17nk, 17nl, 17nm, 17no, 17np, 17nq, 17nr, 17ns, 17nt, 17nu, 17nv, 17nw, 17nx, 17ny, 17nz, 17oa, 17ob, 17oc, 17od, 17oe, 17of, 17og, 17oh, 17oi, 17oj, 17ok, 17ol, 17om, 17on, 17oo, 17op, 17oq, 17or, 17os, 17ot, 17ou, 17ov, 17ow, 17ox, 17oy, 17oz, 17pa, 17pb, 17pc, 17pd, 17pe, 17pf, 17pg, 17ph, 17pi, 17pj, 17pk, 17pl, 17pm, 17pn, 17po, 17pp, 17pq, 17pr, 17ps, 17pt, 17pu, 17pv, 17pw, 17px, 17py, 17pz, 17qa, 17qb, 17qc, 17qd, 17qe, 17qf, 17qg, 17qh, 17qi, 17qj, 17qk, 17ql, 17qm, 17qn, 17qo, 17qp, 17qq, 17qr, 17qs, 17qt, 17qu, 17qv, 17qw, 17qx, 17qy, 17qz, 17ra, 17rb, 17rc, 17rd, 17re, 17rf, 17rg, 17rh, 17ri, 17rj, 17rk, 17rl, 17rm, 17rn, 17ro, 17rp, 17rq, 17rr, 17rs, 17rt, 17ru, 17rv, 17rw, 17rx, 17ry, 17rz, 17sa, 17sb, 17sc, 17sd, 17se, 17sf, 17sg, 17sh, 17si, 17sj, 17sk, 17sl, 17sm, 17sn, 17so, 17sp, 17sq, 17sr, 17ss, 17st, 17su, 17sv, 17sw, 17sx, 17sy, 17sz, 17ta, 17tb, 17tc, 17td, 17te, 17tf, 17tg, 17th, 17ti, 17tj, 17tk, 17tl, 17tm, 17tn, 17to, 17tp, 17tq, 17tr, 17ts, 17tt, 17tu, 17tv, 17tw, 17tx, 17ty, 17tz, 17ua, 17ub, 17uc, 17ud, 17ue, 17uf, 17ug, 17uh, 17ui, 17uj, 17uk, 17ul, 17um, 17un, 17uo, 17up, 17uq, 17ur, 17us, 17ut, 17uu, 17uv, 17uw, 17ux, 17uy, 17uz, 17va, 17vb, 17vc, 17vd, 17ve, 17vf, 17vg, 17vh, 17vi, 17vj, 17vk, 17vl, 17vm, 17vn, 17vo, 17vp, 17vq, 17vr, 17vs, 17vt, 17vu, 17vv, 17vw, 17vx, 17vy, 17vz, 17wa, 17wb, 17wc, 17wd, 17we, 17wf, 17wg, 17wh, 17wi, 17wj, 17wk, 17wl, 17wm, 17wn, 17wo, 17wp, 17wq, 17wr, 17ws, 17wt, 17wu, 17wv, 17ww, 17wx, 17wy, 17wz, 17xa, 17xb, 17xc, 17xd, 17xe, 17xf, 17xg, 17xh, 17xi, 17xj, 17xk, 17xl, 17xm, 17xn, 17xo, 17xp, 17xq, 17xr, 17xs, 17xt, 17xu, 17xv, 17xw, 17xx, 17xy, 17xz, 17ya, 17yb, 17yc, 17yd, 17ye, 17yf, 17yg, 17yh, 17yi, 17yj, 17yk, 17yl, 17ym, 17yn, 17yo, 17yp, 17yq, 17yr, 17ys, 17yt, 17yu, 17yv, 17yw, 17yx, 17yz, 17za, 17zb, 17zc, 17zd, 17ze, 17zf, 17zg, 17zh, 17zi, 17zj, 17zk, 17zl, 17zm, 17zn, 17zo, 17zp, 17zq, 17zr, 17zs, 17zt, 17zu, 17zv, 17zw, 17zx, 17zy, 17zz, 17aa, 17ab, 17ac, 17ad, 17ae, 17af, 17ag, 17ah, 17ai, 17aj, 17ak, 17al, 17am, 17an, 17ao, 17ap, 17aq, 17ar, 17as, 17at, 17au, 17av, 17aw, 17ax, 17ay, 17az, 17ba, 17bb, 17bc, 17bd, 17be, 17bf, 17bg, 17bh, 17bi, 17bj, 17bk, 17bl, 17bm, 17bn, 17bo, 17bp, 17bq, 17br, 17bs, 17bt, 17bu, 17bv, 17bw, 17bx, 17by, 17bz, 17ca, 17cb, 17cc, 17cd, 17ce, 17cf, 17cg, 17ch, 17ci, 17cj, 17ck, 17cl, 17cm, 17cn, 17co, 17cp, 17cq, 17cr, 17cs, 17ct, 17cu, 17cv, 17cw, 17cx, 17cy, 17cz, 17da, 17db, 17dc, 17dd, 17de, 17df, 17dg, 17dh, 17di, 17dj, 17dk, 17dl, 17dm, 17dn, 17do, 17dp, 17dq, 17dr, 17ds, 17dt, 17du, 17dv, 17dw, 17dx, 17dy, 17dz, 17ea, 17eb, 17ec, 17ed, 17ee, 17ef, 17eg, 17eh, 17ei, 17ej, 17ek, 17el, 17em, 17en, 17eo, 17ep, 17eq, 17er, 17es, 17et, 17eu, 17ev, 17ew, 17ex, 17ey, 17ez, 17fa, 17fb, 17fc, 17fd, 17fe, 17ff, 17fg, 17fh, 17fi, 17fj, 17fk, 17fl, 17fm, 17fn, 17fo, 17fp, 17fq, 17fr, 17fs, 17ft, 17fu, 17fv, 17fw, 17fx, 17fy, 17fz, 17ga, 17gb, 17gc, 17gd, 17ge, 17gf, 17gg, 17gh, 17gi, 17gj, 17gk, 17gl, 17gm, 17gn, 17go, 17gp, 17gq, 17gr, 17gs, 17gt, 17gu, 17gv, 17gw, 17gx, 17gy, 17gz, 17ha, 17hb, 17hc, 17hd, 17he, 17hf, 17hg, 17hi, 17hj, 17hk, 17hl, 17hm, 17hn, 17ho, 17hp, 17hq, 17hr, 17hs, 17ht, 17hu, 17hv, 17hw, 17hx, 17hy, 17hz, 17ia, 17ib, 17ic, 17id, 17ie, 17if, 17ig, 17ih, 17ii, 17ij, 17ik, 17il, 17im, 17in, 17io, 17ip, 17iq, 17ir, 17is, 17it, 17iu, 17iv, 17iw, 17ix, 17iy, 17iz, 17ja, 17jb, 17jc, 17jd, 17je, 17jf, 17jg, 17jh, 17ji, 17jj, 17jk, 17jl, 17jm, 17jn, 17jo, 17jp, 17jq, 17jr, 17js, 17jt, 17ju, 17jv, 17jw, 17jx, 17jy, 17jz, 17ka, 17kb, 17kc, 17kd, 17ke, 17kf, 17kg, 17kh, 17ki, 17kj, 17kl, 17km, 17kn, 17ko, 17kp, 17kq, 17kr, 17ks, 17kt, 17ku, 17kv, 17kw, 17kx, 17ky, 17kz, 17la, 17lb, 17lc, 17ld, 17le, 17lf, 17lg, 17lh, 17li, 17lj, 17lk, 17ll, 17lm, 17ln, 17lo, 17lp, 17lq, 17lr, 17ls, 17lt, 17lu, 17lv, 17lw, 17lx, 17ly, 17lz, 17ma, 17mb, 17mc, 17md, 17me, 17mf, 17mg, 17mh, 17mi, 17mj, 17mk, 17ml, 17mn, 17mo, 17mp, 17mq, 17mr, 17ms, 17mt, 17mu, 17mv, 17mw, 17mx, 17my, 17mz, 17na, 17nb, 17nc, 17nd, 17ne, 17nf, 17ng, 17nh, 17ni, 17nj, 17nk, 17nl, 17nm, 17no, 17np, 17nq, 17nr, 17ns, 17nt, 17nu, 17nv, 17nw, 17nx, 17ny, 17nz, 17oa, 17ob, 17oc, 17od, 17oe, 17of, 17og, 17oh, 17oi, 17oj, 17ok, 17ol, 17om, 17on, 17oo, 17op, 17oq, 17or, 17os, 17ot, 17ou, 17ov, 17ow, 17ox, 17oy, 17oz, 17pa, 17pb, 17pc, 17pd, 17pe, 17pf, 17pg, 17ph, 17pi, 17pj, 17pk, 17pl, 17pm, 17pn, 17po, 17pp, 17pq, 17pr, 17ps, 17pt, 17pu, 17pv, 17pw, 17px, 17py, 17pz, 17qa, 17qb, 17qc, 17qd, 17qe, 17qf, 17qg, 17qh, 17qi, 17qj, 17qk, 17ql, 17qm, 17qn, 17qo, 17qp, 17qq, 17qr, 17qs, 17qt, 17qu, 17qv, 17qw, 17qx, 17qy, 17qz, 17ra, 17rb, 17rc, 17rd, 17re, 17rf, 17rg, 17rh, 17ri, 17rj, 17rk, 17rl, 17rm, 17rn, 17ro, 17rp, 17rq, 17rr, 17rs, 17rt, 17ru, 17rv, 17rw, 17rx, 17ry, 17rz, 17sa, 17sb, 17sc, 17sd, 17se, 17sf, 17sg, 17sh, 17si, 17sj, 17



マツンの染色体アレーへの漸進的融合を解明した。この分光撮像方法は融合された染色体アレーおよびそれらの境界の微小な変化を強調するのに理想的である。初期および後期が芽球の高度に融合されたクロマチン標本の軌い境界は他の核質とは特異的に区別された(図1)および(10)。これらの構造は個々のまたはグループ化された染色体の特異的機構に対応する可能性がある。

スベクトラキエマーを本発明の方法と組み合わせる使用することにより、このように、健康な組織で起こる発局的変化をモニタすることが可能になった。また、様々な癌性腫瘍は独自の発局性によって特徴づけられるため、スベクトラキエマーシステムおよび本発明の方法を用いてこれらの特徴をモニタし、したがって、例えば、このような癌性腫瘍の(例えば存在および発症)を早期診断することが可能である。

実施例3  
黒色腫の5-アミノレブリン酸を介した光力学療法：類似性マッピングアルゴリズムを用いたスベクトラキエマー分光撮像システムによって測定された光増感剤相互作用

癌性黒色腫の光力学療法 (PDT) は部分的にしか理解されていない [Marcus (1992), Photodynamic Therapy - Basic Principles and Clinical Applications, Hemisphere Publishing Corporation, Marcel Dekker, New York, 219 ~ 268 ページ]。腫瘍の着色の程度と進行の程度との間に強い相関が認められ、明るい腫瘍は暗い腫瘍よりもはるかに良性である [Nelson et al (1988), J. Nat. Cancer Inst., 80, 58~60]。ヒトの着色された黒色腫はPDTには満足に反応せず、(例えばは紅藻の) マラニニクゼ性黒色腫が陽性に反応すると結論づけられた [Favilla et al (1991), Br. J. Dermatol., 75, 718~721]。一方、皮膚癌に対して5-アミノレブリン酸 (ALA) 経口PDTの結果 [Malik et al (1987), Biol. Cell, 60, 33~40] は黒色腫PDTの発局に新たな可能性を開いた。白血芽細胞中で天然前駆体5-ALAから生成されたプロトポルフィリン (PP) は、たとえ低光量でも癌細胞破壊のための効果の高い光増感剤であることが示された [Malik and Luzzati (1987) Brit. J. Cancer, 56, 589~595; Malik et al (1989), J. Photobiol. Photobiol. Photocchem. B, 4, 195 ~ 205; および Uthmaniot and Malik (1992), Cancer Lett., 65, 127~131]。5-ALA-PDTはヒトに適用して、特に癌細胞腫瘍のような皮膚癌ならびに内臓癌性腫瘍の選択的治療に成功した [Peng et al (1992), Int. J. Cancer, 52, 433 ~ 443]。同所的な5-ALA-PDTの適用もしくはその全身系注射は腫瘍の固定およびその光増感の双方において高い選択性を示すことが示された [Kennedy and Rottier (1992), J. Photocchem. Photobiol. B, 14, 215 ~ 292; および Peng et al (1992), Int. J. Cancer, 52, 433 ~ 443]。これらの結果は急速に分裂する癌細胞にお

ける周囲の正常組織に比べて顕著に高められたPb生成および蓄積に直接起因するものである。5-ALA-PDTは選択的腫瘍治療のための安全かつ強力な道具であると考えられており、その目標の1つは黒色腫瘍にそれを開発することである。B16黒色腫細胞におけるPb生成の制御は、効果的な光力学療法を容易にするためのプロトポルフィリンの化学的修飾期によって顕著に増強されることと示された [Malik et al (1987), Biol. Cell, 60, 33 ~ 40]。

本実施例で明らかにしたのは、外因性Pbによる治療に比較した、内因性Pbを蓄積する単一の細胞上での主要な光化学過程および光力学的応答である。Pb蛍光の分光像分析によって、1つの細胞における多数のピクセル変化が明らかになり、少なくとも100×100 (すなわち10,000) の異なるスベクトルが単一の細胞から得られた。分光撮像および類似性マッピングを用い、以下に示すように、単一細胞中の点分光変化および細胞間光増感効果の位置を見出すことが可能であった。

この目的で、ネズミ黒色腫細胞、ラインB16/ローンフ10を、10%フシジン血漿および炭水化物を添加したRPMI-1640培地 [Malik et al (1987), Biol. Cell, 60, 33~40]、組織培養プレートもしくははデカルボックス (Thermanox) カバープレート (Nunc, Naperville IL) で、5%のCO<sub>2</sub>を含む温気のある37°Cの雰囲気下で培養した。移行后再細胞はトリプシンEDTAで脱離させ、1週間2回再培養した。黒色腫B16細胞における内因性Pbの測定法は(1) 癌細胞およびそれに続く(2) 生成成成分からなるものであった。癌細胞は細胞をDMFで48時間処理することによって生成した、これに続いて、段階(2) すなわち5-ALA (0.3mM) との血漿を培養地中の24時間のインキュベーションを行った。5-ALA-培地のpHは7.0に調整した。段階(2) 後、細胞はベレット化し、PBSですすぎ、ボルツァリピン抽出を下記のように行った。外因性ボルツァリピンを用いた実験のために、プロトポルフィリンIX (Sigma) を10%NaOHに溶解し、細胞懸濁液中で10mMで希釈し、24時間、黒色腫培地に添加した。両在化実験のためにフオトリピン (QLT) についても同じ処理を行った。

黒色腫B16細胞は上記のようにDMFおよび5-ALAの作用によってボルツァリピンを蓄積しており、これに対して320~460nmの光で短波長380nmのフアリンクス (黒色光) 源を用いて1~6時間の照射を行い、20W/cm<sup>2</sup>とした。細胞は1~4mW/cm<sup>2</sup>の光量で照射された。照明は量子ラジオメータ光度計J-88型 (Lambda Instrument Co. TP, DE, USA) によって測定した。

B16黒色腫細胞内の光増感中における内因性プロトポルフィリン (内因性Pb) の細胞下層在化を本発明の方法によってスベクトラキエマーシステムで分析した。黒色腫細胞はALAと共にインキュベートし、次いで、個々の生体細胞中の内因性Pbの蛍光を3つのモードで記録し

た。これは(1) 従来の蛍光像、(2) 100×100ピクセルの蛍光像、および(3) 分光類似性マッピングを行い、点マッピング情報から画像を再構築することによって形成された処理画像である。図18aに示すように、生の蛍光像は細胞質溶の全域にわたって内因性Pbの点分布を示した。内因性Pb局在化のこのパターンはミトコンドリアおよびリソソームならびに内臓細胞の蓄積を反映している可能性がある。これらの細胞の小さな光増感中の主観的であることが示された。図19aは、それぞれ図18aに示した細胞の異なる細胞部位に由来し、各々1つのピークを655nm、もう1つのピークを705nmに有する4つの蛍光スベクトルを示す。これらの2つのピークの相対強度は、処理された細胞の細胞内区間における部位の位置によって変わるものではなかった。図19a (実験) に示す1つの蛍光スベクトルは図18aの細胞の1つの小胞から選択された。図18bの画像は、選択されたスベクトル (図19aの実験) を参照として用いた類似性マッピングで再構築された。図18dに示すように、再構築された画像は、膜および内腔蛍光中に明示した。図18dに示すように、1分間の照射中に、細胞中の内因性Pbは漂白され、蛍光強度は低下し、図19bに示す別の測定スベクトルは655nmおよび705nmへの左方向のシフトを示した。これらの2つのピークの間の強度比は細胞中の部位毎に様々な変数を明らかにした。図19aの実験スベクトルを用いた類似性マッピングは、図18dに示すものと基本的に同様な。図18aに示す新たな像を形成した。図18eに示すように、長い照射期間 (3分) の後に、細胞の蛍光像は顕著に影響を受けた。図19cに示すように、図18eの細胞の2つの異なる点から得たスベクトルは650~670nmに1つのピークを有していた。蛍光像 (図18e) もしくは図18fに示したものは図19cの実験で示すスベクトルを参照として用いた類似性マッピングに由来した画像であり、鮮明な小器官構造は認められることができる。これは細胞破壊の結果であると考えられる。したがって、分光変化は2つの主因を示すことができた。その1つは光増感の最も可能性の高い結果としての細胞レベルでの光生成物の形成 [Kontig et al (1993), J. Photocchem. B, 18, 287~290] であり、他方、光照射中の局在化の可能性も排除できない。

異なる細胞下層区間で生成された、ミトコンドリアに蓄積された内因性Pbは本実施例により、顕微鏡環境に保持されることが明らかにされた。光照射は2つの効果、すなわち、いくつかの光生成物の形成およびミクロ環境におけるpH変化を生み出した。酸水性、碱水性、酸度等のミクロ環境の光生成物形成に対する効果および蓄積 [Kontig et al (1993), J. Photocchem. B, 18, 287~290] は単一の生体細胞のミクロ蛍光分光法では分解することが困難である。

極めて異なる細胞内区間局在化が血管増殖地において外因性Pbでインキュベートした単一細胞内で可視化され

た。図20aは彼頃頃領域における外因性Pbの蛍光像および特異的局在化を示し、これはおそらくフィラメントおよび後期を認識するものである。また、蛍光は細胞質溶の他の部位でも認められ、外膜でもわずかに認められた。図20aに示すように、図20aに示した細胞の5つの異なるピクセルのスベクトルは、ピクセル毎に増加する強度のみが異なる2つの固有な特徴的蛍光ピークを明らかにした。主蛍光ピークは670nm、他のピークは625~630nmに位置することが認められた。図20bに示すように、外因性Pbの1分間の光増感により、即座の破壊および再局在化が観察された。中央に配置された外因性Pbは破壊を取り巻く全般的な円形配置に変化した。4つの個々のピクセルに関する図21bに示すように、630nmは完全に消失し、蛍光は650~670nmにシフトした。4つの個々のピクセルに関する図21cに示すように、暗所における追加の5分間の後インキュベーションによって、蛍光の部分的な回復が認められた。新たなスベクトルは異なる細胞下部位において2つのピークを630および670nmに示した。

よって、これらの結果は、血管増殖地に添加された外因性Pbがエンドサイトーシスを介して取り込まれ、エンドサイトーシス-エンドソーム経路を通してゴルジ複合体に供給されたことを示す。エンドソーム局在化に關する仮説はスベクトルへの酸性pHの影響を示す分光分析によって支持される。ボルツァリピン蛍光スベクトルは図19dの影響に関する知見はポットニエ [Pottier (1980), J. Photocchem. Photobiol. B, 18, 6, 103~109] によって示された。外因性Pbのいくらかは外膜に局在化する。光照射は染色蛍光に影響し、外因性Pbからの光生成物の形成を示す。時系列の後インキュベーションはスベクトルの点特性を減少させ、その後は彼頃頃領域に局在化が認められた。顕著な分光シフトはより低酸性の環境でボルツァリピン局在化と光生成物形成を反映するものと考えられることもできる。分光像は単一細胞における細胞下分光変化を可視化および測定することができる。この方法は従来の細胞集団の蛍光分光法とは顕著に異なっている。したがって、細胞質小器官の微細な分光シフトおよび光生成物の局在化を本発明の方法で明らかにすることができた。

実施例4

細胞における薬性薬のミクロ分布に対する生体物の影響および蛍光分光像によるその検出  
血管性 (リネンビルゲイン) サンプルはその組織に膜毛線と呼ばれる内部系生薬を蓄積させている。腎毛線はその光生成物を宿主サンプリに寄与し [Muscettine et al (1989), Proc. R. Soc. Lond. B, 236: 311~324; Lewis and Smith (1971), Proc. R. Soc. Lond. B, 178: 111~129]。後者の排泄物を腎臓無機系生薬として吸収することができ。ムスカチンおよびデリリ [Muscettine and D'Elia (1978), Limol. Oceanogr., 23: 725~734] は血管性サンプリにおけるアノニクシムAの吸収および保持が光によって



増進し、これは鞭毛藻による同化を示唆することを示した。アゾモニウム塩の变化は鞭毛藻の集団密度に影響を与える [Muscante et al. (1989), Proc. R. Soc. Lond. B 236:311~324]、バクテリム (Brythia) (1988), Proc. 6th Int. Coral Reef Sym. Australia, 2:535~540] は鞭毛藻によるアゾモニウムの正統解釈があること、およびアミノ酸の同化によって分解されたあらゆるアゾモニウムは共生関係内で再利用率に達しないことを明らかにした。彼は鞭毛藻の入手可能性が低いことによってこの関係の生産性が妨げられ排除されたことを示唆した。

鞭毛藻はその動物宿主の活性によって生成される遊走およびリッパに富んだ排泄物をいくらか獲得する [Johannes et al. (1970), Limnol. Oceanogr. 15:579~586]。アゾモニウムの内部循環は関係の遊走要求のいくらかを供給する。この遊走保存および回収方法は栄養素水中での生体に不可欠である。しかしながら、回収は損失を防ぐみに過ぎず、成長および再生に必要な付加的な遊走を供給するものではないため、これらの要求を満たすためには外部供給源も必要となる。

鞭毛藻の集団密度は栄養供給によって制限される [Johann-Galberg and Smith (1989), Mar. Ecol. Prog. Ser. 57:173~186;およびCook and Riebel (1987) Symbiosis 4:199~212]。サンゴと密接に関係して生息する共生生物も異化遊走を関係に与与することができ、それら近傍の鞭毛藻密度の増加を招く。メイヤーおよびジョナルズ (Meyer and Schulz (1985), Limnol. Oceanogr. 30:157~166) はサンゴ頭上に滞在する魚がその排泄物で栄養レベルを増加させることによって組織のバクテリアおよび鞭毛藻密度を増加させる可能性のあることを示唆した。

また、サンゴは様々な無脊椎動物を滞在させており、そのいくつかは定着性であってサンゴ骨格に付着しており、他は内部に散在するかサンゴ組織および骨格に覆い被さっている。サンゴに生着するカニであるクリノトラリス・コラリイデス (*Cryptochinus corallicolus*) は巨大なサンゴ骨格中のくぼみに見出し、イヌラエム国エイトルのアフリカイダエ (*Favidae*) サンゴに一般的なものである。ポッツ (Potts (1915), Papers from the department of Marine Biology:33~69) はこれらのカニの形態およびそれらのくぼみについて記載した。しかしながら、カニとその宿主との関係の本質は不明である。サンゴ共生体はそれらの排泄物を、鞭毛藻を含む近隣の藻に寄与することができるとも示唆される。

ビルガバチナエ (*Pygmaeinae*) サラフアミリーを構成するフジツボはサンゴの最終共生体である。何人かと著者はサンゴとフジツボとの間で物質の交換があると主張しているが、そのような関係は未だ確認されていない。クック等 [Cook et al. (1991) Hydrobiologia 216/217:285~290] はフジツボ (*Savignium milleporum*) から排泄されたリッパをの宿主 (*Millepora dichotoma*)

の鞭毛藻によって吸収されることを示した。

イガイ科 (*Lithothamnium*) は生体サンゴの骨格内に増殖する [Wasmann (1980), Reef. J. Soil. Stud. 46:13~54]。その上の堆かれた濾過によって食物を摂取する。また、アストロガラ・ミリオパルム (*Astropera mriophthalma*) に生息するリトフアガ・ソノアソノス (*Lithophaea simpsoni*) によって排泄されるアゾモニウムが宿主サンゴの鞭毛藻によって吸収されることが示された。

したがって、共生的宿主生物の排泄物が周囲環境を富栄養化するものと推測される。これは、葉緑藻濃度の増加によって示される共生体近傍における高い鞭毛藻濃度を招くものである。このような微小な距離において藻の密度を測定することは困難であり、知られている限りにおいて、この距離内での変化は明らかになっていない。

本発明例は、この問題を実験的に解消することのできる本発明の方法の使用を記載するものである。すなわち、スベクトルキエーアゾシステムを用いて、小領域での葉緑素濃度変化を検出する。

葉緑素分子が光で励起されると、自然蛍光として知られる過程によってフロントが解放される。分子から蛍光によって散乱される光はその励起エネルギーより低く、波長の違いは振動エネルギーの損失を示す。生体内での葉緑素の蛍光増光スベクトルはその主峰を685nm付近に有する。多くの光合成色素が溶液中で蛍光を示すことが知られているが、生体内では葉緑素の蛍光が支配的である。なぜなら、他の色素はそれらの吸収したエネルギーを比較的高い効率で葉緑素に転送するからである。この蛍光の測定は葉緑素の検出および見積りするための手段を提供する [Kirk (1983), Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems, Cambridge University, Cambridge, 401~ページ]。365nmもしくは405nmで励起される光と、制御動物組織はそれらの組織中の蛍光物質により、異なった波長で発光する。しかしながら、650nmを超える波長の蛍光源は鞭毛藻中の葉緑素である [Hazel (1985), Mar. Ecol. Prog. Ser. 120:185~191]。ハーディ等 [Hardy et al. (1992), Mar. Ecol. Prog. Ser. 88:247~255] は、可視光線に先立ち葉緑素濃度の現象を明らかにするために葉緑素蛍光を測定した。

この目的で、エイトルのインテュエニエーア・インサチアエムとの前の虹彩で材料を採取した。以下のサンゴおよびその動物物を蛍光分析に用いた。すなわち、フアグリス・ハリコラ (*Favites halicora*) とアカニ (*Cryptochinus corallicolus*)、ゴニオスレ・レチアホルミス (*Goniastrea retiformis*) とリソフアガ・ソノアソノス (*Lithophaea josselyniana*)、およびトロソソフ (*Millepora dichotoma*) とフジツボ (*Savignium milleporum*) である。サンゴは葉緑

素に運び、通気した海水中に保持した。すべての測定は採取2日以内に行った。鞭毛藻はリオナーベツ (*Ra reparia*) でサンゴから分離した [Jomanaes et al. (1970), Limnol. Oceanogr. 15:579~586]。分離した鞭毛藻の蛍光分光濃度は、落葉蛍光顕微鏡に取り付けたスベクトラキエーアゾシステムで行った。分光類似性アソツは、各蛍光アソツから比較的高輝度のビクセルを選択し、次いで蛍光アソツ中の他のすべてのビクセルをこのビクセルと比較することによって作成した。選択されたビクセルに類似した蛍光値を有するビクセルは明るいビクトを呈し、他のビクセルの類似の程度はビクトの陰影で表現される。

生体サンゴの分光値は、サンゴを海水中に配し、接写レンズを取り付けたスベクトラキエーアゾシステムで観察することによって得られた。サンゴは2500のオリエン・キセソソソソ (*Ortel Xenon Lamp*) で照明した。380nm~680nmの広帯域励起光 (トイソ、ショット (Schott)) の励起フィルター (80-39) を用い、そのフィルターは光源とサンゴとの間に配置し、590nmの蛍光フィルター (トイソ、ショット社) の60-69) をサンゴと分光濃度カメラとの間に配置した。

サンゴ上の各ビクセルで得た葉緑素蛍光値は特定部位の葉緑素濃度およびその濃度に関する。サンゴの表面の接写は励起および蛍光の強度に主要な影響を与える。この影響を除去するため、各ビクセルの励起値を系列の最高励起値に調整した (スベクトルの標準正規化)。トランスセクトは共生動物を横切るように画像に沿って描出した。各ビクセルの励起および色発光の強度値を測定した。処理に沿っていずれかの色発光ビクセルを選択し、これを他のビクセルと比較することにより、コンピュータプログラムは、トランスセクト (X軸) および蛍光強度 (Y軸) に沿った波長 (Z軸) の連続して正規化された3次元分光表示を作成した。この3D表示はトランスセクトに沿った相対蛍光強度を、励起に対する地理的影響による補正と共に示した。

ビクセルは共生動物に隣接する画像上ランダムに選択し、4つの連続的なビクセルを追加した。各系列で、第1および第5のビクセル間の距離は2.4mmであった。各ビクセルの発光と励起との比は相対蛍光指標 (RFI=発光/励起) として定義した。5つの連続的なビクセル毎の正規値は、同一系列中の最高値のビクセルに關係付けることによって再び正規化し、各5ビクセル系列の相対値を得た。

鞭毛藻の蛍光スベクトルを測定するため、2つの分離した光源を用いた。図22に示すように、2つの鞭毛藻の蛍光アソツ上の3つのランダムなビクセルの分光曲線は671nmで葉緑素蛍光ピークを示す。

共生体を支持する3つのサンゴを分析した。図23a, 23bおよび23cは正規化前の3つの宿主の多ビクセル蛍光アソツ、および分光分析に用いた処理を示す。トランスセ

クトは共生体を横切った。図23b, 13dおよび23fは上記のように正規化された654nmおよび685nmの範囲における相対強度蛍光を示す。極大発光は670nmにあり、葉緑素aに典型的なものであった。フアグリス・ハリコラ (図23b) ではくぼみの周縁で最高蛍光値が認められ、トランスセクトがくぼみから遠ざかるにつれて蛍光強度が低下しており、くぼみ周縁での高い葉緑素濃度を示している。しかしながら、くぼみ自体からは発光がなかった。ゴニオスレ・レチアホルミスおよびミリアボラ・デイト (それぞれ、図23dおよび23f) ではトランスセクトに沿った明確な蛍光パターンはなかった。イガイのサイホソ領域およびフジツボの開口部からは発光がなかった。

図24a-cは数種の放射状トランスセクトに沿って等間隔で見出される9~11ビクセルの平均値の分析結果を示す。値は共生体に隣接するビクセルに対する相対値である。回帰曲線 (点線) も示す。フアグリスおよびクリフトホルム (図24d) の場合には、明確な蛍光勾配が検出された。

図25a-cに示すように、3つのサンゴに対して分光類似性アソツを構築した。上述のように、類似性アソツのためのコンピュエーアゾ法は単一の選択された特徴的スベクトルを元の画像を構成する残りのスベクトルと比較する。これは、参照アソツと他のすべての間の差を計算することにより、図25a-cに示すような分光類似性を有する新たな画像を作成した。最高類似性を有する最高相対蛍光スベクトルを選択して分光類似性アソツに使用した。図25bはカニのくぼみ周辺の高い葉緑素濃度を強調する。ゴニオスレ・レチアホルミス (図25b) ではイガイ (4mm) のサンゴ近傍により高い傾向があるが、これは相対蛍光値のトランスセクト (図23d) では明示されなかった。ミリアボラ・デイト (図25c) では、共生体 (3mm) 近傍で所在化された葉緑素蛍光の類似したパターンがあり、これは主として、フジツボの血を被覆するとロソソソソ組織上に存在するが、図25bに示すゴニオスレ・レチアホルミスではより不明瞭である。

したがって、本発明例では、本発明の方法を用いた、無脊椎動物共生体を支持する3つのサンゴ種における葉緑素蛍光分布が示された。これらの結果は共生カニ (*Cryptochinus*) のくぼみ近傍に高濃度の葉緑素aを示す。トランスセクトに沿って顕著な葉緑素減少がある。この場合、葉緑素濃度の変化は葉緑素濃度の変化に起因しない。くぼみ周縁の低い葉緑素レベルは有蹄類に由来するものであり、これらの藻はくぼみ型に存在する支配的な藻類である。ゴニオスレ・レチアホルミスおよびミリアボラ・デイトとの場合、共生動物の葉緑素濃度の違いによる顕著な違いはない。しかしながら、分光類似性アソツによって、ゴニオスレ・レチアホルミスおよびミリアボラ・デイトとの場合には鞭毛藻の変化を抽出することが可能になった。類似性アソツの利点は一



表2

染色体	蛍光体	蛍光ピーク	ダイスプレィ色
8	SpectrumOrange TM 1	568 nm	茶 (B1)
10	SpectrumGreen TM 1	538 nm	シヤレ
(C)			
X	Aqua 1	480 nm	青 (B2)
1	Texas-Red 2	615 nm	黄 (Y)
17	FITC 3	525 nm	緑 (G)
11	Texas-Red 2 + FITC 3	615, 525 nm	赤 (R1)
backg.	DAPI 4		黒 (B3)
1	V. y. s. s. D. o. w. n. e. r. s. G. r. o. v. e. I. L. U. S. か		
ら細胞デオキシスクリオチドとして得られるもの。			
2	ブローブを含有するキメラグリダイスしたジキシグニンと抗ジキシグニン抗体を介して結合したもの		
3	ブローブを含有するキメラグリダイスしたジキシグニンと抗ジキシグニン抗体を介して結合したフルオレセイン-5-イソチオシアネート		
4	カルシタ染色に用いられる4' , 6-ジエミジロー-2-フェニルニトール		

図27に示した6つの蛍光体の各々の正規化された分光シグネチャから、数個の比較的低い分光範囲で測定を行うリアルタイムシステムでは、スペクトル同士が大きく重なり合っているため、異なるブローブ種を識別することは不可能であることが明らかである。このようなシステムは、各ブローブの強度の絶対測定により依存し、したがって、バックグラウンド信号およびノイズにより影響される。さらに、細胞自体に由来する自然蛍光でも分光の重なりが生じることに留意された

い、この場合にも、各ビクセルについて分光情報を得られることによって、自然蛍光の寄与が除去でき、より正確な結果が得られる。図28の各点の全スペクトルを測定することによって、ブローブの特性の問題も克服することができ、異なるブローブの組合、ある染色体DNA配列に適合するブローブが別の(通常は類似した)配列に対してもより低い特性を有し、この第2の配列にもより低い強度でハイブリッド化すること、この結果、ある種のブローブが異常に

多くなる、異なる外観を呈することになる。しかしながら、ブローブの化学的環境の小さな変化により、第2の組合の蛍光スペクトルは第1のものからわずかにシフトしている。スペクトラキエーションシステムは、その分光分解度および感度により、この影響を解消することができ、同様な影響は、サンプル製剤中に完全に溶解されなかったブローブについても存在し、異なる特性の診断に寄与する。したがって、本発明の方法と組み合わされたスペクトラキエーションシステムは、異なる診断の異なる危険性を低減することを助けるものである。多数のものしくは類似した染料に一般化して、図26aおよび26b-cの列は、多数のブローブを抽出および識別することが可能であること、および、それらの間に小さな分光差が存在していれば、スペクトラキエーションの測定でそれらを抽出かつ同定することを示している。

当業者には、他のおよび/もしくは既知のおよび未発見または未開拓の蛍光体および蛍光体の組み合わせを上述の様々なFISH用途に使用して多数の部位を同時に抽出したり、各染色体の各型を特有の色で染色したりできることが明らかである。従来の細胞および分子生物学で使用される蛍光体のリストは、Rastan (1993), Introduction to Fluorescent Probes: Properties History and Applications in Fluorescent and Luminant Probes for Biological Research, Macmillan, Academic Press社, London, 24-31ページに見出される。また、例えば、生物蛍光および化学発光のような他の標識法ならびに非蛍光標識法も同時に適用できることが当業者には明らかである。

したがって、FISH分析にスペクトラキエーションシステムを使用することによって、以下のような主要な利点を得ることができる。スペクトラキエーションシステムはその高分光分解度によって多数のブローブの同時抽出を可能にするのに対し、従来の手段を用いて(例えば蛍光顕微鏡を用いて) FISHを行うと、1回のハイブリダイゼンションに使用されるブローブ数が2〜4に制限される。したがって、FISH分析にスペクトラキエーションシステムを使用することによって、労力および時間が節約される。さらに、FISH分析にスペクトラキエーションシステムを使用すると全分析に少数の細胞しか必要でなくなるが、これは分析すべき細胞の数が限られている場合には重要な特徴である。

#### 実施例6

糖尿病性網膜症は増進的視覚状態であり、多くの場合、時期を得たレーザー治療で制御することができ、[Ferris (1993), (解説) JAMA 269:1290-1291]。米国眼科学会は患者が治療されるべき臨床的状態を向時進行させたかを検出するクリーニンングシステムを示した [Diabetic Retinopathy: American Academy of O

phthalmology Preferred Practice Patterns, San Francisco, Cal.; American Academy of Ophthalmology Quality of Care Committee Retinal Pains, American Academy of Ophthalmology, 1989]。

しかしながら、示されたスクリーニンングシステムは高価であり、また、ある個人にとっては、患者は時折スクリーニングされた検査の間に深刻な網膜症を進行させることもあるため、現在の高価なスクリーニングでも充分ではない、それにも関わらず、スクリーニングは費用効率が高いことが示されている [Javitt et al (1989), Ophthalmology 96:265-64]。この研究は、危険性の高い患者と低い患者をより効果的に同定できれば、健康管理追跡検査にかかる大きな金額が節約できることを示している。したがって、糖尿病性網膜症のスクリーニングの精度を向上し、それにかかる費用を低減することのできるあらゆる方法は臨床的価値の高いものとなる。

現在、糖尿病性網膜症のためのスクリーニング評価として推奨されているものには、詳細な網膜写真および、選択された場合におけるカラー網膜写真が含まれる [Diabetic Retinopathy: American Academy of Ophthalmology Preferred Practice Patterns, San Francisco, California; American Academy of Ophthalmology Quality of Care Committee Retinal Pains, American Academy of Ophthalmology, 1989]。網膜のフルオレシニン血管造影法は現在日常的に行われているが、侵略的で、不承のものであり、時には死を招く。さらに、フルオレシニン血管造影法で得られる付加的な情報は患者を即座のレーザー治療のリスクを受け得るものとならない [Ferris (1993), (解説) JAMA 269:1290-1291]。

本発明によれば、スペクトラキエーション技術を利用して開発されたフルオレシニンと組み合わせ、分光データと画像情報を同時に使用することにより、網膜血管の異なる段階を分類することができ、したがって、医師が多くの糖尿病患者を重症のものとは非重症のものとは分類することを可能にする臨床手段となる。

網膜への薬液供給は脈絡膜および網膜血管の双方によって提供される。脈絡膜は無欠陥の外網膜中の光受容体への薬液源であり、網膜血管は内網膜中の中皮要素および神経線維への薬液供給を維持する上で重要な役割を果たす。網膜の高い薬液要求により、糖尿病性網膜症、高血圧、糖尿病性網膜症、および血管閉塞性疾患において観察されるような循環変化は機能障害および広範囲網膜組織損傷を招く。

ヒックハム等 [Hickham et al (1963), Circulation 27, 2735] により、網膜中の薬液供給の非侵襲的な測定が初めて提案されたが、これは光学ディフュージョンを適切な網膜管に対して2波長写真法 (560および640nm) を使用するものである。より進んだ方法はBeltroni (1968), Applied Optics 27, 1113-1125に提案されたベクトル偏光 (P)

teman) およびデュリング (Duling) の3波長法に基づくものである。

スベックラキューブシステムは、自らが決まる分類情報に基づき、診断書に於けるヘモグロビンの測定値を自動的に算出するだけでなく、自らが増減傾向を把握し、測定値に適合するデータを探し出し、その結果を診断書に反映させることができる。ニュートラルネットワークシステムは、自らに設定された分類基準に基づき、診断書に於けるヘモグロビンの測定値を自動的に算出するだけでなく、自らが増減傾向を把握し、測定値に適合するデータを探し出し、その結果を診断書に反映させることができる。ニュートラルネットワークシステムは、自らに設定された分類基準に基づき、診断書に於けるヘモグロビンの測定値を自動的に算出するだけでなく、自らが増減傾向を把握し、測定値に適合するデータを探し出し、その結果を診断書に反映させることができる。

生体組織における多くの化学物質は管胞および細胞の機能に關係する。たとえば閉塞性血腫の主要原因は、酸素一および酸素一形状のヘモグロビン濃度を通して測定可能な酸腫であったとしても、MDA、MD、MDA、フラビン、チトクロム等、他の構成成分の濃度を測定することによつても重要な情報を得ることができよう。必要かつ特定の測定で利用可能な時間およびコンセンサスの量と得ることのできる情報量、感度、精度および物質性とは相対的である。

従来の技術の多くが、このような組織中の各成分の分光特性を出、反斜する吸収ピーク、およびむしろは青色光における蛍光ピークを単独果もしくは多波長異相定でそれらの濃度に相関させるものとして偏重していることを考えれば、本発明の方法と組み合わせるスペクトロキエーテジシステムはこのような成分の1つ以上の濃度を同時にマッピングするために使用することができる。スペクトロキエーテジシステムが動作させる特定のハードウェアによって、得られる情報の型および量が決定されるのである。

例えば、最も単純かつ最も直接的な構成は、スベントラキマエフを基底部カメラのODのポートに取り付けて網膜が撮像されるようにすると同時に、基底部カメラの同じ広帯域白色光源を用いて網膜からの反射光を測定する。この場合、散乱強度はドモリ(Domori)のモデルシステムを用いて測定することができ [Domori (1985), Appl. Optics Vol. 27, 1113, 1988, およびAppl. Optics Vol. 28, 1061; おびDomori et al. (1980), Vision Research, Vol. 20, 1099]、また、同様に、撮像された画像の全ピクセルに拡張することができ、スベントラキマエフに基づいたより複雑なシステムは (1) 自然蛍光分光撮像、(2) UVもしくは青色蛍光面起ラゾフを用いる分光撮像、(3) 単一で、連続して、もしくは順次に、波長650, 442, 378, 357, 325, 400, 448, 308, 378, 370, 355, および他の同様な波長を有する同等な波長のいずれかあるいはラゾフ面起蛍光を用いる分光撮像である。

これらの構成はいくつかの形式で構築することが可能であり、独立していてもよく、また、同一の装置中でいまいかなる数の組み合わせに結合してもよい。装置は光源（複数でもよい）、基底部カメラおよびスベントラキエゾからなり、データを解析し、眼科医に有用なように

表示するためのコンピュータおよびソフトウェアを含む。

白色光反射、自然蛍光、半波長選択波レーザ励起蛍光、もしくは多波長レーザ励起蛍光の場合、サンプルは照明され、分光像が測定される。

パルスレーザ（複数でもよい）照明の場合、スベクトラキミューアの乗除方法は若干変形され、いくらかの基本的でも実質的でもないが装置の作動に重要なハードウェア変更を必要とする。これらは以下の通りである。

準・パルスレシーフ面迎着光分光濃度の場合、レーザパルスとスベクトラキエータのCDのレーザ取り込みとを干渉計の走査角度と同期させ、各レーザにおいて干渉計をステップを行い、新たなレーザ・コンピュータによって収集されるようにする（一般に狭パルスを各レーザのために使用することもできるが、この数はレーザ群に変化しないようにする）。こうして、各ODDにおいて、インテグレーションは所定の（偶な）数のレーザパルスに対応する。これは、各レーザを同一の照明強度で取り込むことを確保するために必要であり、またなければ、各レーザは異なる数のレーザパルスによる露光を決定することになり、インテグレーションは歪められる。

数バリエーションに構築された分光分光画像の場合、実験方法は2つの手法で行うことができる。すなわち

(1) 上述のように順に各バリエーションについて全分光立方体を収集すること、これは、測定中に1つのバリエーションを活性させること、最後には各バリエーションについて1つの測定された分光立方体が存在するようにすることを意味する、と(2) 各バリエーションに干渉計およびフーリエ取り込みと同期させてバリエーション、すべてのバリエーションの前に干渉計スラフおよび次のフーリエの取り込みの間に切り替えるようにし、最後には1つの分光立方体のみが測定されるようにすることである。

最後に、当然、すべての情報と分析および解析しなければならぬ。最も重要なアルファリーヌは、画像の異なった波長間および異なったピクセル間で得られる強度を比較するものとなる。これらのアルファリーヌは強度の変換、および組織中の異なった細胞間および異なった波長間の比を考慮すべきである。この方法は極めて感度が高く、また、大きな定量的価値を提供するものであるたわりとなり得る。

他の用途は当業者に明らかであろう。これらには尿結  
核、急性区分別尿結核、虚血性視神経症、角膜炎  
および虹彩障翳等による視覚喪失、および現在白色光や由  
来の異なる蛍光を用いた撮像法で分析されている多くの  
他のものが含まれる。

実施例7  
腸、膀胱、肺、頸部および他の器官における生体内での  
癌性組織のマッピング

スベクトラキエーブシステムは内視鏡および遠視鏡を含むあらゆる遠視光学要素に取り付け可能であるため、手術前、中、もしくは後において外科医が切開の開始部位、停止部位を決定したり、遠視組織が手術において除去されたかどうかを判断する助けになり得る。スベクト

ラキニオンシステムは本質的に組織の性質を、その分光特性に関係した化学組成を通して分析し、使用者が把持光軸のもとで行動を行うための視覚的フィードバック(通常強調されたもの)を提供する。このために本装置に用いている生体内で密性組織を検出する場合、ハードウェア構成および関連する分析および表示アルゴリズムの両方は上述の眼科の実験例(実験例6参照)に類似している。連いた集光光学要素(基礎部からメタリックな異なる型の内臓)、検出に関連するかのような基本分子成分の型であり、これらのいくつかは、酸基濃度変化のようにおそろしく共通しており、他の付加効果の中には「グリーン」およびエラスチン、DNAカプセルのような細胞核内の場合と物質等である。多岐長もしくはバリエーションの違いにおける照明および同期化の要求も同様である [Pittie et al., Paper presented at European Biomedical Optics Week b y SPIE, 1995年8月12-16日, Barcelona Spain]。

主要コンポーネント解析を用いた細胞および組織分類による診断病理学の補助

今日、細胞および組織の頭状核染色に基づいて診断および手術の決定が多くなされてゐる。後者は、血腫、腫および頭蓋ミアおよび果すブールのような細胞ミア、もしくは着色および／もしくは固着された細胞に基づいて決定を行う。典型例として広く知られたPapamitzがあり、これはペトリオラ (Pettit) ランゲス頭蓋核を染色するため、多数の頭蓋ミアについてなされ

解剖は病理学者により行われるが、病理学者は長年にわたって顕微鏡を通して観察し、細胞の形態、色彩、核および細胞質の相対サイズ、発生する細胞およびその他の空間的な特徴などに基いて、細胞の起源および分類を要請に学んでいる。病理学者はまた、ミシアに見られる残存物質および人工物を無視することを学んでいる。このような検査はしかしながらたんに主観によるところが多く、毎日行われるべき検査があまりに多いため、しばしば技術者が予備試験を行って、深い検査を必要とする疑いのある細胞もしくは組織のみを病理学者に提供している。但し、予備検査は人間のミスよりもはるかなどによりある程度信頼性に欠ける可能性がある。

病理学分野においては、このようなテストの客観性および信頼性をもつと向上させるとともに自動化すべきであるという必要性が広く認識されている。今日、病理学者は最終診断を行う必要があるが、将来において差別および診断が自動的に行えるようになることは確信できるものではない。

買い換後も引き続きアルゴリズムを有したSpectraCut<sup>®</sup>デクローザーは、病歴診断の全ステージにおいて、選別において用いることができ、病理学者による診断における客観性及び信頼性の向上の助けとなり、いずれが完全な自動診断の助けとなりえる。

病気に応じた細胞は、病気の重篤さおよび段階に応じて化学的に大きく変化することが見知られていて、その結果、これらの変化は、分光分析ソフトウェア、着色細胞もしくは組織の光透過、自己蛍光、通光フローの蛍光もしくは顕微鏡画像における反相コントラストとして現れる。分光分析と撮像と組み合わせられるSpectraCubeソフトウェアは、これら全てのモード順列に用いることができ、これらの特性を抽出すると同時に定量測定を行うための非常に優れた装置であり、適切な数値的な処理を行うことにより、病理学者もしくは放射線診断決定のための測定結果を提示することができきる。

表示および変換のために用いられるアルゴリズムは上述のいずれもの、例えば、異なるタイプについての類似マッピングおよび分類法、主要コンポーネント解析法、神経ネットワーク法、その他の当業者にとって明らかな方法である。

図28へ図30)には、影射病理学の方針での本発明を用いる方法を示している。図28は、マニニカラウイルス(すなわち、Papovavirus)用に通常的に用いられる頸管スミチア(すなわち、Papovavirus-Embryo着色細胞)について、本発明の方法を用いて得られた透過顕微鏡観察イメージを示す。イメージ(画像)の中央の細胞(A-マージ部であり、細胞の核を示す)はHPV (human Papilloma virus) 細胞(すなわち、癌性の細胞)の頸管細胞であり、一方、イメージの右下部細胞(B-マージ部であり、細胞の細胞質を示す)が正常頸管細胞である。符号aおよびbは多形核細胞(すなわち、好中球)を示し、細胞細胞の核をB符号で示し、癌性細胞の細胞質をそれぞ示す。これらの細胞は白黒イメージで示されている(但し、オリジナルはカラーである)ため、若干不鮮明であるが、これらの境界は手付け付けられた人工的な線で区別されている。

得られ、スベクトルキー—メージは上述の主要コンポーネント解析が行われる。この目的のため、全スベクトルレンジ(450nm—800nm)が20の狭い波長レンジに分割され、それぞれにおける各ピクセルの光強度に基く20の白黒イメージとして参照する。言い換えれば、20の所定主要コンポーネントが存在する。これらのイメージは、上述の行列(マトリクス)  $B$  の列を形成するために用いられる。行列  $B$  および  $C$ 、さらに行列  $C$  の固有ベクトル  $V$  および固有値  $\lambda_i$  が上述のようにして得られる。図10aにおいて、固有値  $\lambda_i$  が、20の異なる主要コンポーネント、すなわち、波長レンジ  $i$  ( $i=1, \dots, 20$ ) の間数としてプロットされる。図10aは、ピクセル強度としてピクセル行列  $V$  の値を用いて得られた固有モードイメージ

示し、これは白黒カメラを通して観察されるオリジナルイメージと、図28のように白黒イメージとして表示されたイメージと非常に良く似ている。しかしながら、図から分かるように、サンプリングに固有の重要なサンプル情報を有しておらず、サンプリングを通して光に影響され、縦横斜方向のサンプルを主として有する。一方、図30b、30cに示されるように、多くの固有ベクトル、例えば、 $BV_{10}$ および $BV_{11}$ を用いて同様に得られた強度イメージは新たな効果を示す。癌性細胞（図28のA）の端部のまわりのピクセルおよび癌性細胞のみが他の部分より高い強度（図30b、30cにおける白色ゾーン）を示し、一方、正常細胞（図28のB）は他のイメージ部分より低い強度（図30b、30cにおける暗色ゾーン）を示す。このため、図29に示されるように、検査イメージにおいて存在値が非常に低い主要コンポーネント10および13に依存する物質もしくは構造は、それがなんであれ、癌性細胞に特有であり、正常細胞の下で表されるということを精確付けすることができる。このため、あるタイプの細胞もしくは細胞の一部のみが行列Bおよび固有値 $BV_i$ とともに構成される一つもしくは複数のイメージを示すという事実を、本発明の方法により測定されるときに各タイプを分類するために用いることができる。

また、先の実米国特許出願第08/392,019号に、二次元CCDセンサおよび電子機器を組み合わせて得られる特に高感度の干渉法に基づくユニークな分光強度システムが述べられており、これによれば、空間的に連続した方法で何百何千ものサンプルを同時に特定しコンピュータに記憶することができ、本発明は、これらの機器（ハードウェア）が生物研究、医学治療および診断にどのように用いることができるかということを述べる。ここに提案される方法における分光分析と撮像との組み合わせ方法は新たな分野を開くものであり、これを分光生物撮像と称する。

本発明が扱っている点は、分光測定および測定データをサンプリングの全ての点（すなわち、ピクセル）において独立して且つ同時に収集できるので、サンプリング位置と数として物質および分子タイプおよびその集中度に関する情報を提供でき（これにより物質の存在および集中度をサンプリング化できる）、さらに、これと同時に従来の撮像法も同時に得ることができる（これにより従来の形態学的解析（例えば、米国特許第4,985,725号参照）も可能となる）。このため、本発明は、光透過、反射、散乱および蛍光法を用いて高い空間およびサンプル解像度で、細胞および組織成分、構造、器官、遺伝物質、致と蛍光追跡プローブの存在検出および定量検査や、細胞および組織内での致と薬剤の分配測定を行うことができる。

本発明のさらなる効果は、分光分析データの交換が非常に単純であることである。本発明に係るデータは位置座に集められるのではなく、撮像面から集められ、い

くつかの波長ではなく多数の波長に対して集められるという事実から、本発明は、（1）例えば、同一の患者の癌性および非癌性組織表面を比較するので、各患者の組織を比較する場合は異なり、着色効果を自動的に除去することができる、（2）異なる波長での強度の比較を行うことができるので、求める特性からは独立したサンプル効果を自動的に除去することができる、（3）一旦、システムソフトウェアが適切な特性強調（例えば、人工色もしくは他の手段の使用）を行ったり、適切なディスプレイ（例えば、コンピュータの画面もしくはビデオ画面）上に強調イメージを表示したりすると、イメージにおける求める特性およびその効果を容易に視覚化してユーザに示すことができる。

本発明のさらなる効果は、リアルタイム、格子およびその他の分散技術による周知のFollettもしくは多重効果フーリエ変換分光分析であり、これはサンプル測定において高いS/N比を示す。但し、ノイズレベルが信号から独立している（背景もしくはシステム限定動作）時、およびノイズが信号の平方根に比例し（フオートノイズ制限）且つ信号が全サンプルレベルレンジでの平均信号より高い場合である。

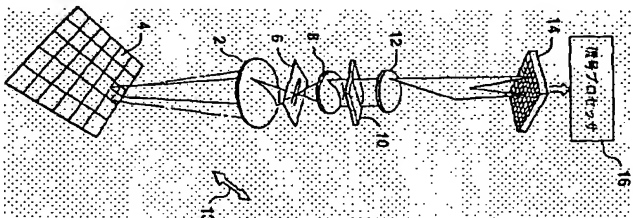
本発明のさらなる効果は、先の実米国特許出願第08/392,019号に詳細が示されている空間的な光学形状により、このシステムコンセンサトおよびシステムハードウェアそのものを撮像すべきどのようなサンプル表面にも用いることができ、現存するもしくは将来開発されるどのような撮像光学系にも用いることができるということである。

本発明の重要な点はまた、計測データを意味ある方法で変換し表示するためにコンピュータソフトウェアとして用いられる数多くの数学的アルゴリズムである。同一の機器（主として研究分野のユーザ用であり、様々な作業が可能となる）において、もしくは別の機器（業務家用であり、特化された迅速な作業が可能となる）において、さらに、種々の用途に応じて要求される多様性の組み合わせおよびレベルにおいて、多くのタイプのアルゴリズムを用いることができるのは明らかである。このアルゴリズムは（現在および将来、この技術分野で知られている）サンプル情報の変換に基づくものとする

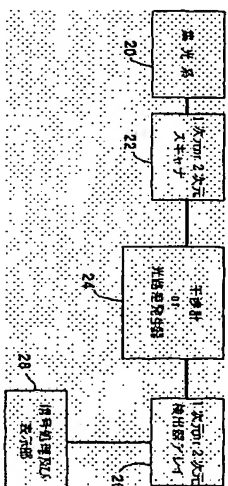
ことができる。このようなものとしては、特定の化学エレメントもしくは分子のサンプル吸収もしくは発光ピークがあり、このような化学物質の集中度マップ、もしくはは濃度に形態的に用いられる。このとき、イメージ形状および現在および将来のイメージ処理アルゴリズム、もしくはサンプルおよび撮像情報の組み合わせが用いられ、このようなものとしては、例えば、主要コンポーネント解析、算術演算、背景除去もしくは異なるタイプの分類分けによる全ピクセルのサンプル間での比較、異なるピクセルもしくは空間範囲間の比較、および異なる波長もしくは空間範囲間の比較がある。

当業者によれば、上述の撮像システムもしくはは撮像分光分析システムに付属のものを用いて、もしくはは将来出現する撮像装置を用いて、上記のものと類似もしくは異なる多量の用途を見いだすことができるのは明らかである。

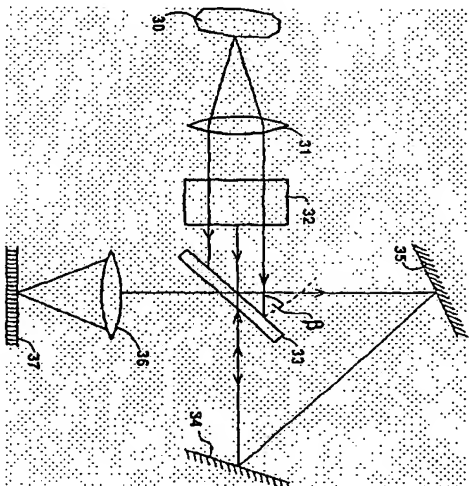
【第1図】



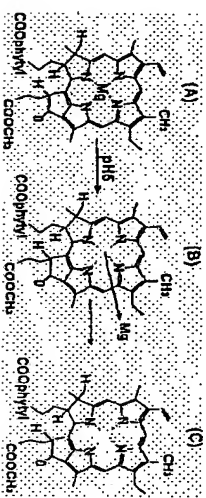
【第2図】



【第3図】

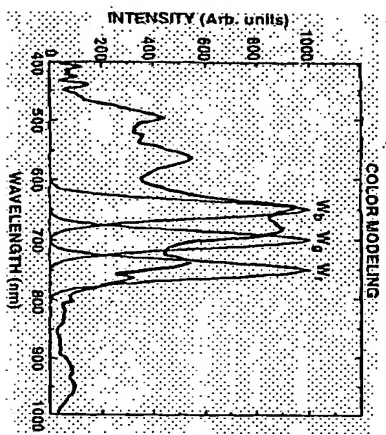


【第5図】

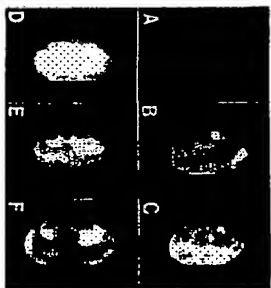




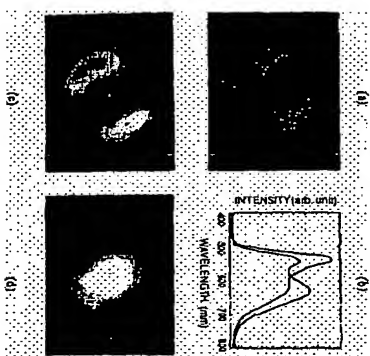
【第4図】



【第12図】



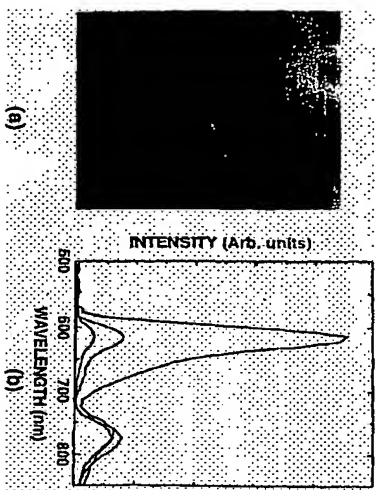
【第6図】



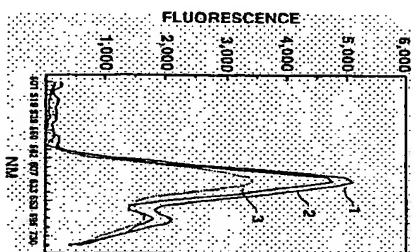
【第14図】



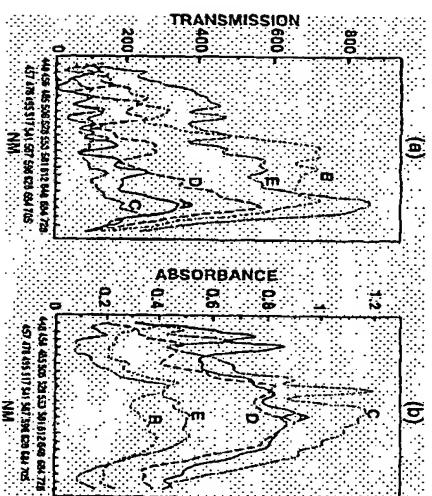
【第5図】



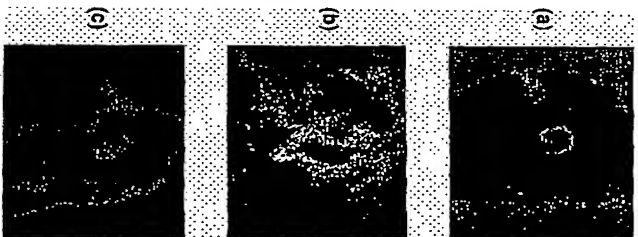
【第13図】



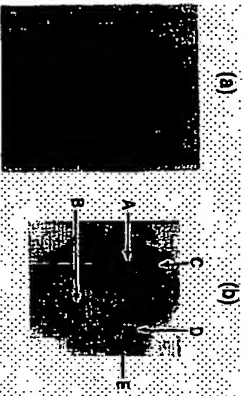
【第9図】



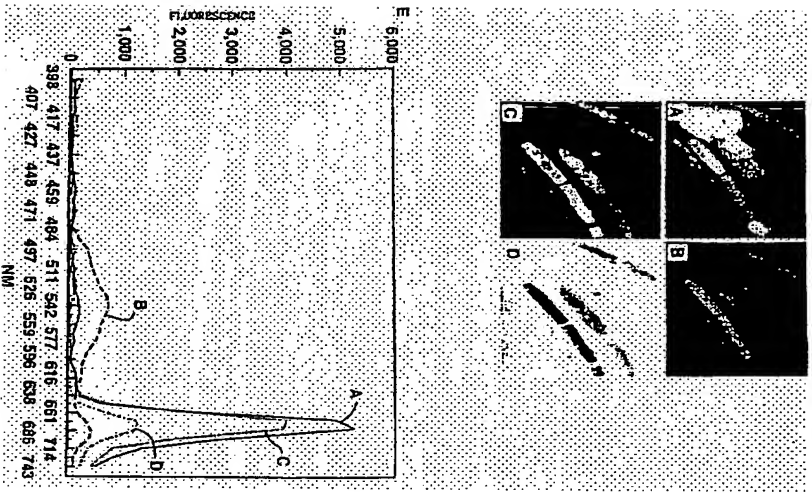
【第25図】



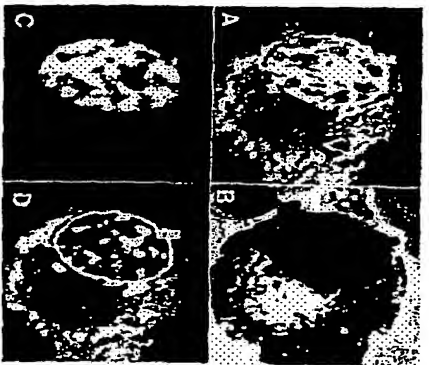
【第8図】



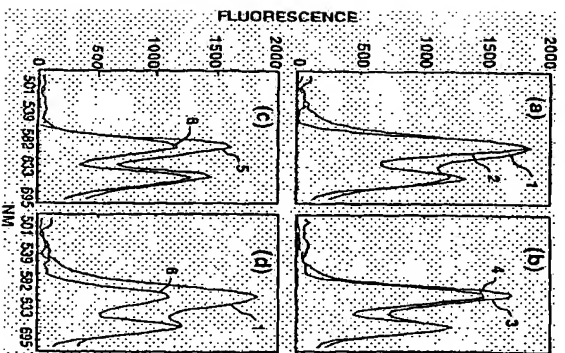
【第7図】



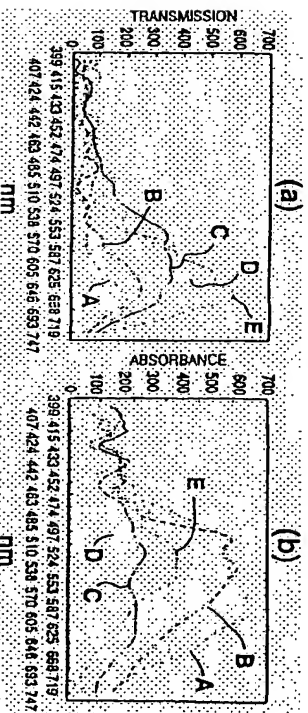
【第10図】



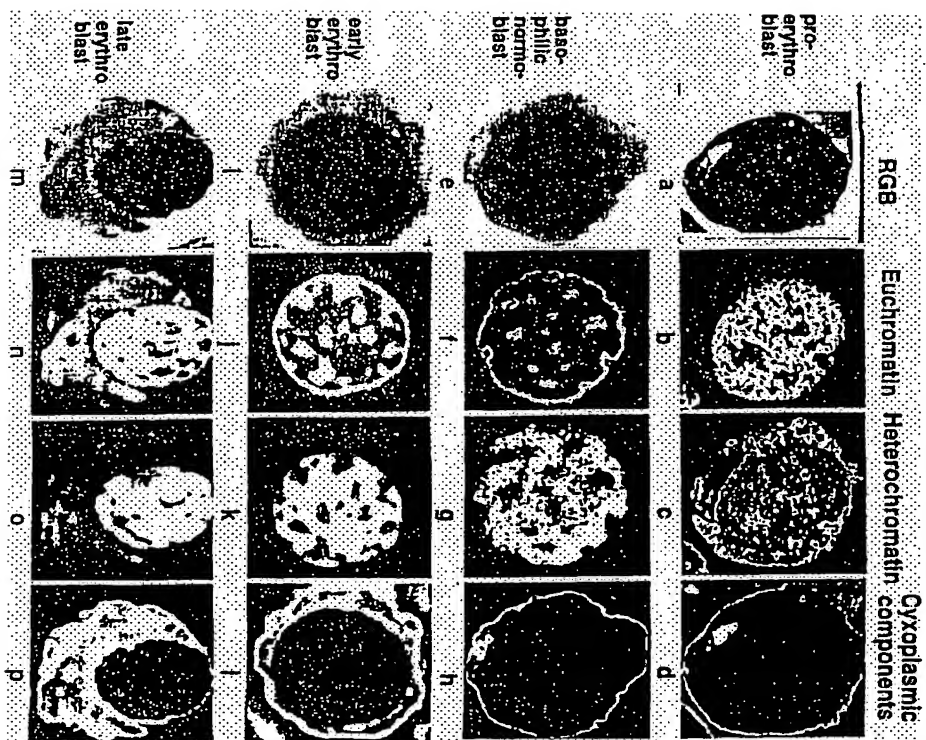
【第11図】



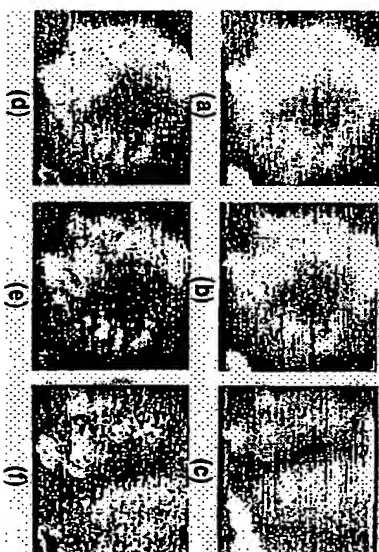
【第16図】



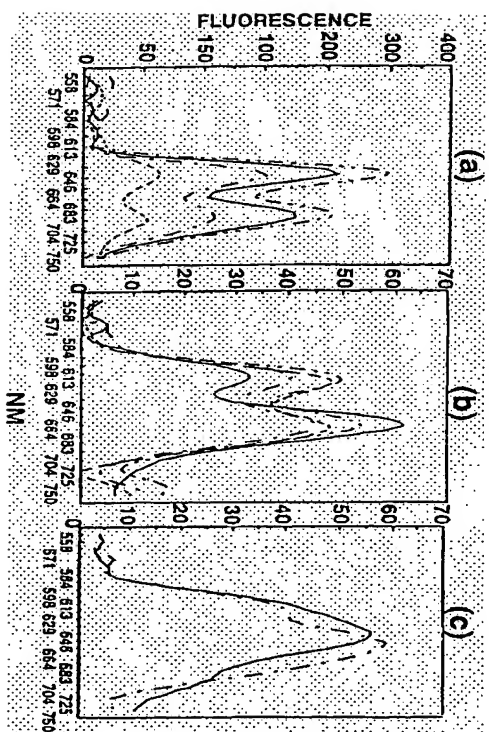
【第17図】



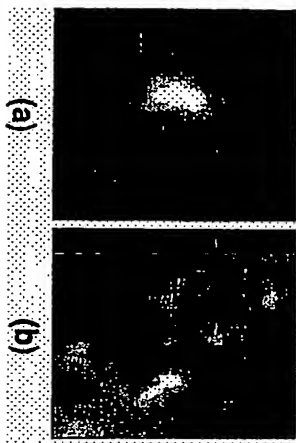
【第18図】



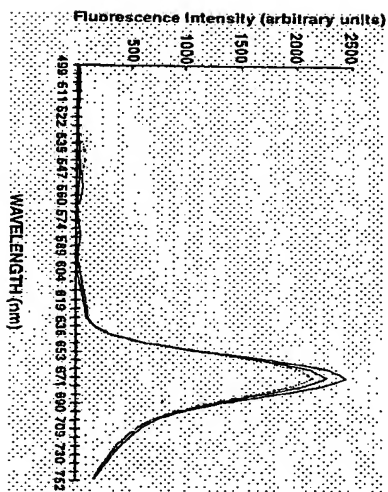
【第19図】



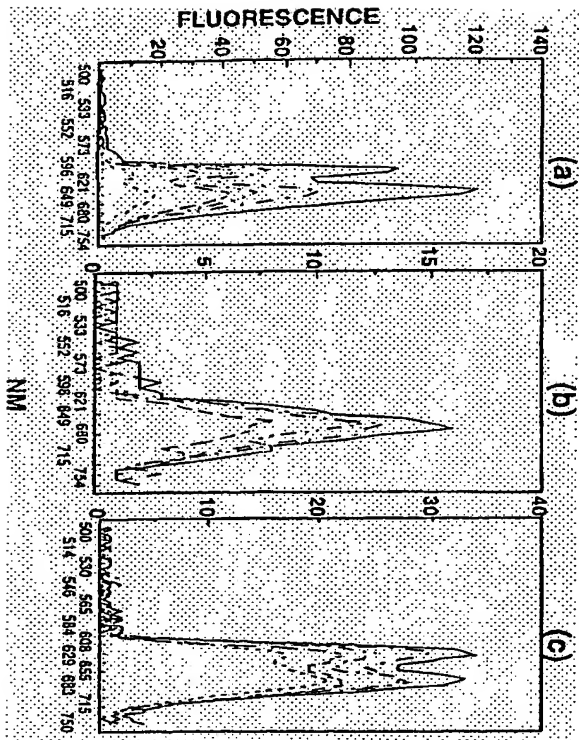
【第20図】



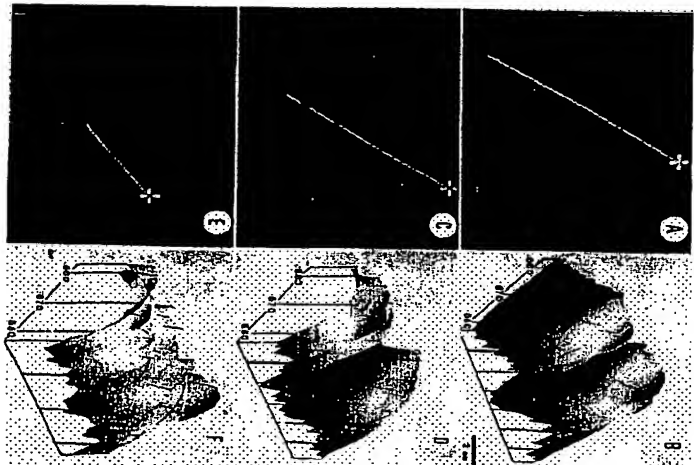
【第22図】



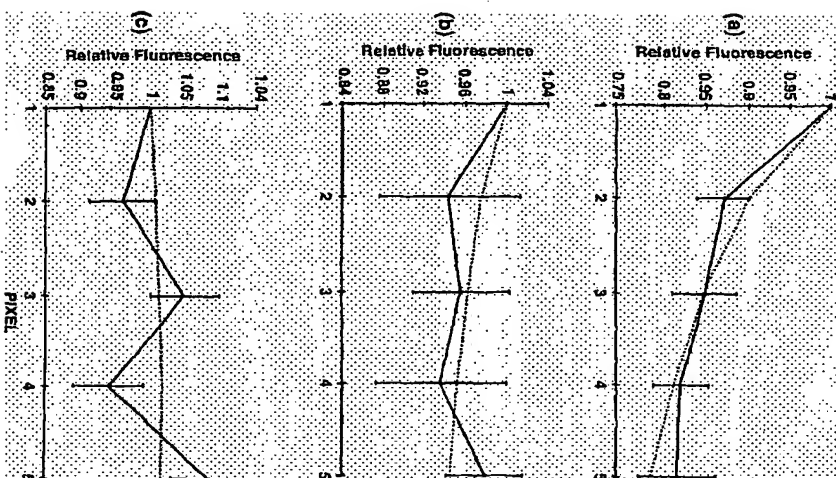
【第21図】



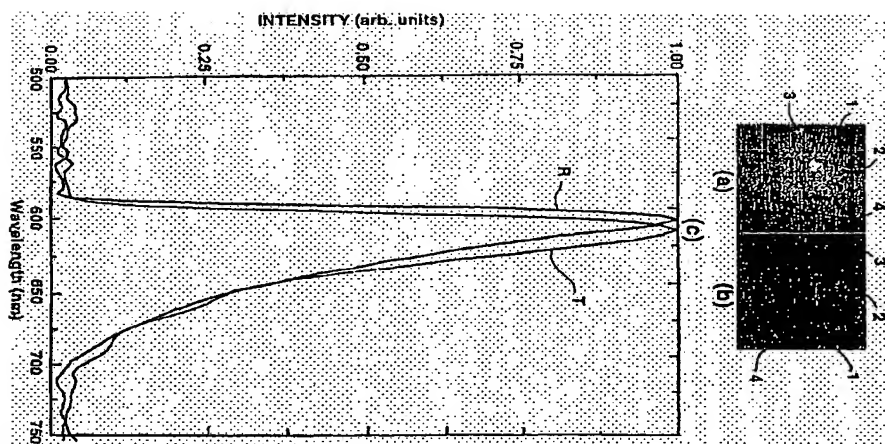
【第23図】



【第24図】



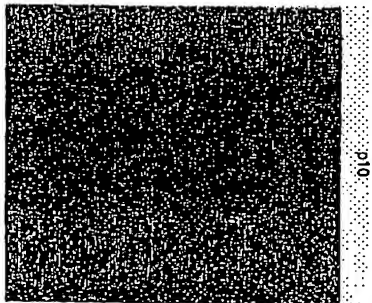
【第26図】



【第30a図】

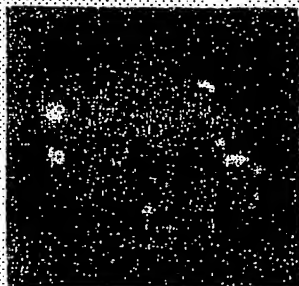


【第30b図】

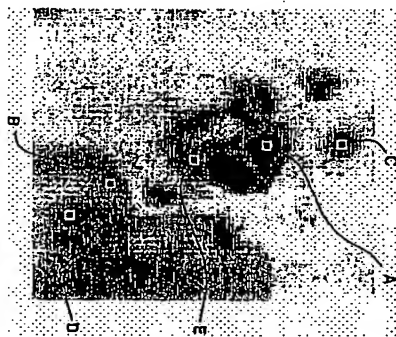




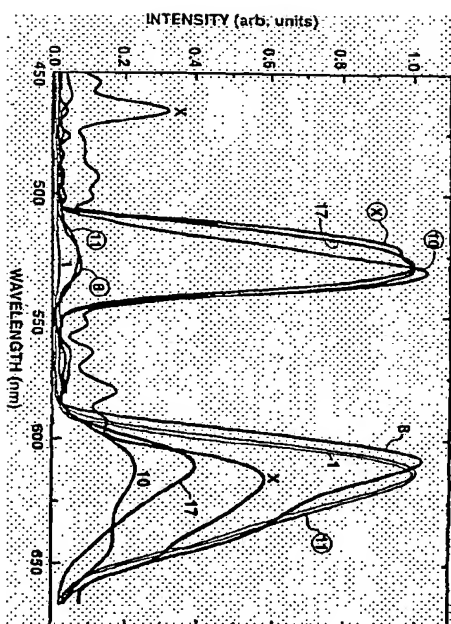
【第27図】



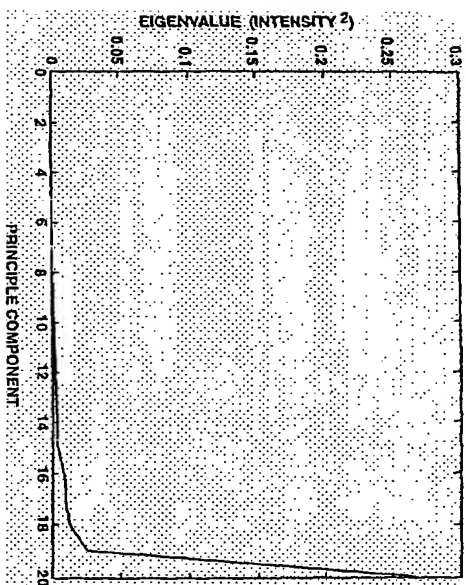
【第28図】



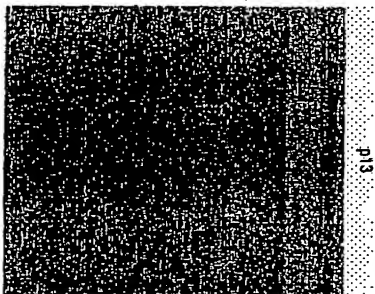
【第27c図】



【第29図】



【第30c図】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>  
G01B 11/00  
G01J 3/443

識別記号

F I  
G01J 3/443  
G01N 21/27

E

特許第3280035号

G01N	21/27	21/64	E
	21/64	33/48	P
	33/48	33/483	C
G02B	21/36	G02B 21/36	
	21/36	A61B 3/12	E

(72)発明者

(56)参考文献

ダーク ジー ソエンクゼン  
アメリカ合衆国、カリフォルニア  
92008、カールスバッド、チエシヤイア  
3638

10

(72)発明者

タリオ カビナ  
イスラエル国、ティムラート 23840、  
ハボルヌ 7

(72)発明者

ロバート エー バックワルド  
イスラエル国、ラマト イシヤイ  
30095、ハダダストリート

15

(72)発明者

ジビ ヴリツク  
イスラエル国、クラマール ハロエ  
38955、

20

特開 平4-339225 (J P, A)  
特開 平7-301552 (J P, A)  
特開 昭61-88116 (J P, A)  
特開 平1-112122 (J P, A)  
特開 平7-244239 (J P, A)  
特開 平5-126746 (J P, A)  
特開 平7-10814 (J P, A)  
特開 平5-256834 (J P, A)  
特開 平6-300884 (J P, A)  
特開 平7-174631 (J P, A)  
特開 平7-209187 (J P, A)  
特開 平5-503367 (J P, A)  
特開 平11-503239 (J P, A)  
米国特許4976542 (U S, A)  
米国特許5539517 (U S, A)  
国際公開95/18236 (WO, A1)  
国際公開95/20148 (WO, A1)

25

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, DB名)

G01N 21/62 - 21/74  
G01N 21/06 - 21/01  
G01N 21/17 - 21/61  
G01N 33/48 - 33/50  
G01J 3/06 - 3/52  
EPAT (QUESTEL)  
JICST7744 (JOIS)  
WPI/L (QUESTEL)  
実用新案 (PATOLIS)  
特許新案 (PATOLIS)

30

35

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**